



UNIVERSITA' DI NAPOLI FEDERICO II

**DOTTORATO DI RICERCA
BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE
XXII CICLO**

***STUDI SUL RUOLO DELL'INIBITORE CITOSOLICO DI
RIBONUCLEASI***



Dottorando: Dott. Marco Moscato
Relatore: Prof.ssa Adriana Furia

ANNO ACCADEMICO 2008/2009



UNIVERSITA' DI NAPOLI FEDERICO II

**DOTTORATO DI RICERCA
BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE
XXII CICLO**

***STUDI SUL RUOLO DELL'INIBITORE CITOSOLICO DI
RIBONUCLEASI***

**Dottorando
Dott. Moscato Marco**

Relatore:
Prof.ssa Adriana Furia

Coordinatore:
Prof. Giuseppe D'Alessio

Anno Accademico 2008/2009

RINGRAZIAMENTI E DEDICHE

Anche se questa esperienza è giunta al termine, non posso non ricordare con affetto tutte le persone che l'hanno resa possibile: innanzitutto vorrei ringraziare il mio docente-guida e relatore, la prof.ssa Adriana Furia, la cui esperienza scientifica ha rappresentato un costante punto di riferimento e i suoi preziosi consigli sono risultati fondamentali per la mia crescita professionale.

Rivolgo un sentito ringraziamento al prof. Giuseppe D'Alessio che mi ha consentito di svolgere al meglio il mio lavoro di ricerca.

Ringrazio il prof. Lucio Nitsch e il dott. Gaetano Cali per la collaborazione offerta.

Vorrei ringraziare anche la dott.ssa Elena Confalone il cui aiuto in laboratorio è stato fondamentale.

Ringrazio i miei genitori che hanno sempre sostenuto le mie scelte.

Una dedica particolare va al mio amico Marco che mi ha dato la forza di cambiare e di superare momenti difficili.

Infine ringrazio tutte le persone che mi sono state vicine in questi anni: nonni, zii, amici e colleghi.

RIASSUNTO

L'Inibitore citosolico di Ribonucleasi (cRI) è una proteina ubiquitaria, evolutivamente conservata, di circa 50 kDa; una peculiare caratteristica di questa proteina è l'alto contenuto di cisteine. cRI è un potente *scavenger* di ROS in vitro; l'ossidazione dei tioli provoca la formazione di ponti disolfurici intra-molecolari con un meccanismo del tipo tutto-o-nulla, innescato dall'ossidazione di residui cisteinici adiacenti altamente reattivi. È stato dimostrato che lo stress ossidativo determina (la formazione) di una forma ossidata di cRI in cellule intatte; d'altronde la deplezione di cRI aumenta la sensibilità della cellula allo stress ossidativo. Queste prove suggeriscono fortemente un ruolo per cRI nell'omeostasi redox cellulare. Ho eseguito esperimenti di coimmunoprecipitazione alla ricerca di proteine interagenti con cRI. A tal scopo, una forma ricombinate di cRI con il tag 3xFlag è stata espressa in cellule HeLa. Flag-cRI e le proteine interagenti sono state immunoprecipitate e l'eluizione è stata eseguita con il tampone di caricamento Laemmli o per competizione con il peptide 3xFlag. Gli immunocomplessi sono stati analizzati mediante SDS-PAGE, western blotting e spettrometria di massa. I risultati mostrano che, nelle condizioni usate per gli esperimenti di coimmunoprecipitazione anti-Flag, diverse proteine legano cRI: in particolare una banda di 40 kDa corrispondente all'actina è stata identificata. La coimmunoprecipitazione inversa anti-actina ha confermato l'interazione Flag-cRI-actina. Altre proteine come la catena pesante della miosina non muscolare II-a, la tubulina, la GAPDH, la glicoproteina di membrana di 210 kDa dei pori nucleari, la proteina dello shock termico di 71 kDa, la sintasi degli acidi grassi, EF-Tu, sono state

identificate in immunocomplessi mediante spettrometria di massa. Analisi citologiche di immunofluorescenza indicano che cRI, actina e tubulina colocalizzano parzialmente. Inoltre, analisi pull-down hanno dimostrato che l'interazione del Flag-cRI con actina purificata è inibita da reagenti tiolici. Questi risultati suggeriscono che cRI, come *scavenger* di ROS, potrebbe proteggere il citoscheletro da stress ossidativi. Comunque nelle mie condizioni sperimentali, cRI non forma ponti disolfurici con altre molecole in cellule HeLa, né in condizioni basali né dopo un trattamento con agenti ossidanti. Dall'esame degli estratti nucleari e citoplasmatici di cellule HeLa, come anche dalle analisi di immunofluorescenza, è emerso che cRI non è esclusivamente localizzato nel citosol, ma è presente anche nel nucleo.

SUMMARY

The cytosolic Ribonuclease Inhibitor (cRI) is a ubiquitous, evolutionarily conserved protein of about 50 kDa; a peculiar feature of this protein is the high cysteine content. cRI is a potent *scavenger* of ROS *in vitro*; thiol oxidation induce intra-molecular thiol-disulfide transition with an all-or none pattern, initiated by oxidation of highly reactive adjacent cysteine residues. It has been shown that oxidative stress induce the oxidized form of cRI in intact cells; on the other hand cRI depletion increases cell sensitivity to oxidative stress. This evidence strongly suggests a role for cRI in intracellular redox homeostasis. I have performed coimmunoprecipitation experiments searching for proteins interacting with cRI. To this aim, a recombinant form of cRI with the tag 3xFlag was expressed in HeLa cells. Flag-cRI and its interacting proteins were immunoprecipitated and elution was performed with the Laemmli loading buffer or by competition with the 3xFlag peptide. Immunocomplexes were analyzed by SDS-PAGE, western blotting and mass spectrometry. Results show that, in the conditions used for anti-Flag coimmunoprecipitation experiments, several proteins bind cRI: in particular a 40 KDa band corresponding to the actin was identified. The converse anti-actin coimmunoprecipitation also confirmed the Flag-cRI-actin interaction. Other proteins, such as tubulin, myosin heavy chain II-a, Dynein Heavy chain 1, GAPDH, the 210 kDa nuclear pore membrane glycoprotein, the 71KDa heat shock cognate protein, EF-Tu, Fatty Acid synthase were also identified in immunocomplexes by mass spectrometry. Immunofluorescence cytological analyses indicate that cRI, actin and tubulin partially colocalize. In addition, pull-down analyses show that Flag-

cRI interaction with purified actin is inhibited by thiol reagents. These results suggest that cRI, as *scavenger* of ROS, may protect cytoskeleton from oxidative stress. However, in my experimental conditions, cRI doesn't form disulphide bridges with other molecules in HeLa cells, neither at baseline or after treatment with oxidant agents. In addition, analyses of nuclear and cytosolic extracts of HeLa cells as well as immunofluorescence analyses show that cRI is not exclusively localized in the cytosol but is also present in the nucleus.

INDICE

• INTRODUZIONE	Pag. 1
1) <i>Caratteristiche dell’Inibitore citosolico di Ribonucleasi</i>	Pag. 1
2) <i>Conservazione evolutiva dell’Inibitore citosolico di Ribonucleasi</i>	Pag. 5
3) <i>Ipotesi sul ruolo biologico dell’Inibitore citosolico di Ribonucleasi</i>	Pag. 6
• SCOPO DELLA TESI	Pag. 12
• MATERIALI E METODI	Pag. 13
1) <i>Struttura dei plasmidi utilizzati</i>	Pag. 13
2) <i>Culture cellulari e trasfezione in cellule eucariotiche</i>	Pag. 14
3) <i>Preparazione di lisati cellulari</i>	Pag. 15
4) <i>Coimmunoprecipitazione</i>	Pag. 16
5) <i>Analisi citologica di cellule HeLa mediante immunofluorescenza</i>	Pag. 18
6) <i>Preparazione di estratti nucleari e citoplasmatici</i>	Pag. 18
7) <i>Saggio di legame di cRI all’actina</i>	Pag. 19
8) <i>Trattamento di cellule HeLa con agenti ossidanti</i>	Pag. 20
• RISULTATI	Pag. 23
1) <i>Ricerca di proteine citosoliche interagenti con cRI</i>	Pag. 23
2) <i>Localizzazione di cRI nella cellula</i>	Pag. 28
3) <i>Modulazione del legame di cRI-actina in ambiente riducente</i>	Pag. 32
4) <i>Identificazione di altre proteine coimmunoprecipitate con cRI</i>	Pag. 35
5) <i>Analisi di cRI dopo trattamento con agenti ossidanti</i>	Pag. 38
• DISCUSSIONE	Pag. 49
• BIBLIOGRAFIA	Pag. 51

INDICE DELLE FIGURE E TABELLE

•	Figura 1	Pag. 3
•	Figura 2	Pag. 4
•	Figura 3	Pag. 24
•	Figura 4	Pag. 24
•	Figura 5	Pag. 26
•	Figura 6	Pag. 27
•	Figura 7	Pag. 29
•	Figura 8	Pag. 30
•	Figura 9	Pag. 31
•	Figura 10	Pag. 32
•	Figura 11	Pag. 34
•	Figura 12	Pag. 35
•	Figura 13	Pag. 37
•	Figura 14	Pag. 39
•	Figura 15	Pag. 41
•	Figura 16	Pag. 42
•	Figura 17	Pag. 43
•	Figura 18	Pag. 44
•	Figura 19	Pag. 45
•	Figura 20	Pag. 46
•	Figura 21	Pag. 47
•	Figura 22	Pag. 48
•	Tabella 1	Pag. 36

INTRODUZIONE

1) Caratteristiche dell'Inibitore citosolico di Ribonucleasi

La scoperta dell'Inibitore di Ribonucleasi risale al 1952 quando Pirotte e Desreux nel corso dei loro studi trovarono, nel fegato di maiale, un'attività che inibiva le Ribonucleasi di tipo A. Da allora è cominciata la ricerca sull'Inibitore di Ribonucleasi per comprenderne le proprietà strutturali e la funzione biologica.

L'Inibitore citosolico di Ribonucleasi (cRI) deve il suo nome alla capacità di legare *in vitro* con alta affinità (le costanti di dissociazione K_d sono nell'ordine delle concentrazioni femtomolari) e con una stechiometria 1:1, proteine della famiglia delle Ribonucleasi monomeriche extracellulari di tipo pancreatico, inibendone l'attività enzimatica.

cRI è una proteina acida con pI ~4.7 (gli amminoacidi acidi rappresentano il 13% della composizione amminoacidica), ubiquitaria ed evolutivamente conservata, molto abbondante nel citoplasma delle cellule (in cui costituisce circa lo 0.01-0.1 % delle proteine totali), con un peso molecolare di ~50 kDa. (R. Shapiro 2001).

L'Inibitore è molto ricco in residui di cisteina e la sua struttura primaria è caratterizzata da ripetizioni ricche in leucina (LRR), le quali svolgono un ruolo chiave nel legame ad alta affinità tra l'Inibitore stesso e le Ribonucleasi monomeriche inibite appartenenti alla superfamiglia della Ribonucleasi A (B. Kobe & J. Deisenhofer, 1995). cRI è in grado di legare diverse proteine di questa superfamiglia: RNasi pancreatica bovina (RNasi A), RNasi pancreatica umana (RNasi 1), la neurotossina derivata da eosinofili (RNasi 2), RNasi dell'epidermide umana (RNasi 7), la

angiogenina, la forma sperimentale monomerica della Ribonucleasi seminale bovina (BS-RNasi). Purificato con successo da diversi tessuti di mammiferi (da placenta umana, da fegato di maiale, di bovino e di ratto), (K.A. Dickson et al 2007) cRI presenta sequenze conservate in molte specie e, in particolare, se si paragonano le sequenze primarie dell'Inibitore umano (hRI, costituito da 460 amminoacidi, 32 residui di cisteina e 15 LRR) e di maiale (pRI, costituito da 456 amminoacidi, 30 residui di cisteina e 15 LRR) si riscontra il 77% di identità.

Analizzando la sequenza amminoacidica dell'Inibitore umano (hRI) sono state riscontrate le seguenti caratteristiche: acetilazione della metionina N-terminale che funge da protezione contro l'attacco delle aminopeptidasi, presenza di 32 residui di cisteina, presenza di una treonina fosforilata in posizione 82 (N. Dephoure et al 2008), presenza di 15 ripetizioni ricche in leucina (LRR) lunghe alternativamente 28 e 29 amminoacidi tra i residui 20 e 447. A livello di questa regione i residui apolari (quasi sempre di leucina) si alternano a residui polari, conferendo alle ripetizioni carattere anfipatico. Sono stati identificati due tipi di ripetizione che si alternano nella struttura primaria: una definita di tipo A, costituita da 8 ripetizioni di 28 a.a. con un'identità del 24-52%, l'altra definita di tipo B, costituita da 7 ripetizioni di 29 a.a. con un'identità del 29-64% (Fig. 1).

Struttura primaria dell'Inibitore di Ribonucleasi umano: lo schema mostra l'allineamento delle ripetizioni interne e l'alternanza di ripetizioni di tipo A e di tipo B

I due tipi di ripetizioni hanno in comune la presenza di un amminoacido idrofobico (Leu nell'84% dei casi), nelle posizioni 2-5-7-12-20-24. La posizione 10 è occupata da Cys nella ripetizione di tipo A, mentre la stessa posizione è occupata da Asn nella ripetizione di tipo B. Le LRR sono motivi strutturali presenti in molte proteine coinvolte in processi di riconoscimento molecolare, in fenomeni di trasduzione del segnale, adesione cellulare, riparazione del DNA, processamento dell'RNA, ecc...(B. Kobe e J. Deisenhofer 1993-1995). Nella formazione della struttura tridimensionale dell'Inibitore di Ribonucleasi hanno un ruolo importante le 15 LRR, ciascuna delle quali forma un'unità β - α *hairpin*; in tale struttura il filamento- β e l' α -elica sono tra loro paralleli e le varie unità sono allineate e sono approssimativamente parallele ad un'asse comune. La struttura risultante presenta così una forma peculiare a ferro di cavallo (Fig. 2).

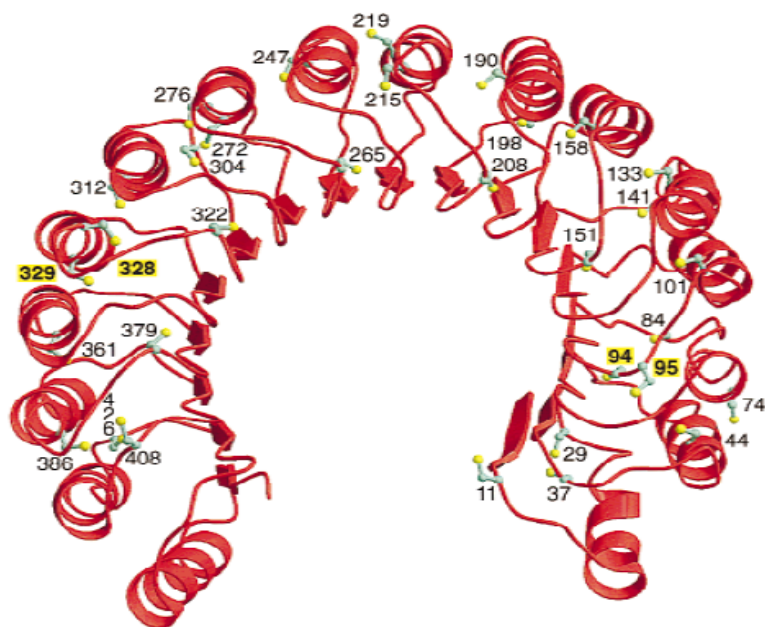


Fig. 2

La struttura tridimensionale dell'Inibitore di Ribonucleasi umano: sono evidenziate le catene laterali dei 32 residui di cisteina.

I filamenti- β paralleli formano il foglietto- β curvato che si trova nella circonferenza interna del ferro di cavallo che ha la sua faccia concava esposta al solvente. Le leucine e gli altri residui alifatici sono le componenti essenziali del *core* idrofobico della proteina e servono a stabilizzare le interazioni tra le unità LRR. I segmenti ad α -elica, invece, sono allineati a formare la circonferenza esterna. La lunghezza delle eliche varia da 9 ai 14 residui. I filamenti- β sono in genere costituiti da 3 residui e ognuno di essi forma legami a idrogeno con i filamenti adiacenti; solo i filamenti N-terminali sono più lunghi. I *loops* di connessione β - α e α - β , infine, contengono dai 4 ai 9 residui amminoacidici.

2) **Conservazione evolutiva dell'Inibitore citosolico di Ribonucleasi**

cRI è una proteina altamente conservata, presente in mammiferi (J. Hofsteenge 1997), uccelli (R. B. Caldwell et al 2005) e pesci (predizione effettuata per analisi computazionale automatica e presente nel database NCBI delle proteine di *Danio Rerio*). In particolare le sequenze amminoacidiche dell'Inibitore umano, di maiale, murino e di ratto condividono il 66% di identità (J. Hofsteenge et al 1988; F.S. Lee et al 1988; M. Kawanomoto et al 1992); un terzo dei residui differenti sono in realtà sostituzioni conservative. L'Inibitore umano e quello di maiale sono le proteine meglio caratterizzate ed esibiscono proprietà pressoché simili.

Il gene umano codificante l'Inibitore è stato isolato nel 1990 e, mediante tecniche di *ibridazione in situ*, è stato localizzato sul braccio corto del cromosoma 11 (11p15.5) (S. M. Zneimer et al. 1990). Solo una copia del gene di cRI esiste nel genoma umano e gli Inibitori isolati dai diversi tessuti della stessa specie tipicamente hanno la stessa sequenza amminoacidica. In verità, sono state identificate piccole differenze solo nella 5' UTR di mRNA da placenta umana, codificanti cRI, contenenti siti di *splicing* alternativi. (Crawford et al 1989).

Il gene dell'Inibitore umano si è evoluto per duplicazione di esoni (M. C. Haigis et al. 2002), infatti analisi strutturali del gene di cRI rivelano che vi è una corrispondenza diretta tra esoni ed unità LRR: ogni esone codifica per 2 segmenti contenenti ciascuno una α -elica e un filamento- β . Inoltre, gli esoni sono esattamente della stessa lunghezza (171 basi) e presentano un alto grado di identità (50-60% per i 7 esoni interni).

Sebbene un'attività inibitoria di Ribonucleasi sia stata individuata in anfibi (H. Nagano et al 1976) e in insetti (Y. Aoki & S. Natori 1981), le proteine

responsabili non sono state caratterizzate e le loro relazioni con l'Inibitore di mammifero sono sconosciute.

3) *Ipotesi sul ruolo biologico dell'Inibitore citosolico di Ribonucleasi*

Il significato biologico della interazione “*in vitro*” cRI-Ribonucleasi monomeriche di tipo pancreatico non è ancora chiaro, in quanto cRI risiede esclusivamente nella cellula, mentre le Ribonucleasi inibite sono proteine secrete. Sulla base di numerosi studi in letteratura sono state avanzate due ipotesi sul ruolo biologico dell'Inibitore ed entrambe potrebbero essere in parte valide:

L'ipotesi “sentinella” secondo cui cRI protegge l'RNA cellulare dalla degradazione, inibendo l'attività di RNasi che potrebbero essere, con meccanismi diversi, internalizzate. Molti ricercatori hanno riportato dati a sostegno della ipotesi che cRI possa neutralizzare l'azione catalitica di RNasi penetrate nel citosol impedendo la degradazione di RNA cellulare. Le RNasi ad azione citotossica hanno infatti la proprietà di sfuggire al legame e alla inibizione da cRI (M.C. Haigis et al 2003; D.M. Monti & G. D'Alessio 2004).

Secondo l'ipotesi “*scavenger*” cRI partecipa alle difese antiossidanti della cellula come *scavenger* di radicali liberi dell'ossigeno. Questa ipotesi è alla base del lavoro che ho svolto, ricercando interazioni di cRI con altre proteine cellulari; dunque descriverò ampiamente i dati di letteratura che la sostengono.

L'ipotesi *scavenger* deriva dall'intuizione di Hofsteenge e collaboratori (M. Blasquez et al. 1996) secondo cui l'Inibitore di Ribonucleasi, con il suo elevato contenuto di cisteine, giocherebbe un ruolo nella regolazione

dell'omeostasi redox cellulare: 32 residui nell'Inibitore umano, tutti presenti in uno stato ridotto all'interno delle cellule. Lo stress ossidativo rappresenta la modificazione del normale equilibrio intracellulare tra sostanze ossidanti, prodotte fisiologicamente durante i processi metabolici, e il sistema di difesa antiossidante che svolge la funzione di neutralizzarle. Eventuali disturbi del normale stato redox cellulare possono causare effetti tossici per la produzione di perossidi e radicali liberi che danneggiano tutti i componenti della cellula incluse proteine, lipidi e DNA. Ai residui di cisteina di cRI è stato attribuito sia un ruolo strutturale che funzionale ed è noto che la capacità di inibire le Ribonucleasi è rapidamente inattivata da reagenti bloccanti i tioli quali p-idromercuribenzoato ed N-etilmaleimide o da agenti ossidanti quali DTNB (acido 5,5'dithiobis-2-nitrobenzoico). *In vitro*, studi effettuati con il DTNB hanno rilevato due importanti caratteristiche: la reazione di inattivazione di cRI è del tipo “tutto-o-nulla” perché la modificazione di pochi gruppi tiolici determina il cambiamento conformazionale della proteina con conseguente incremento della velocità di reazione degli altri gruppi: cRI modificato non ha più tioli liberi ma 15 ponti disolfurici intramolecolari che ne aumentano la sensibilità alla proteolisi (M. Fominaya & J. Hofsteenge 1992).

M. Blazquez *et al.* hanno dimostrato che in cellule LLC PK1 (una linea derivante da cellule del tubulo prossimale del rene), in cui è stato indotto stress ossidativo mediante H_2O_2 alla concentrazione di 2 mM, si ha un decremento negli estratti dell'attività d'inibizione di Ribonucleasi, causata da una diminuzione della quantità di proteina. Tali risultati dimostrano che un ambiente ossidante comporta la perdita dell'attività di cRI ma non

dimostra un coinvolgimento dell'ossidazione dei residui cisteinici causata dalla H_2O_2 .

Per saperne di più sul ruolo svolto dall'ossidazione dei gruppi tiolici di cRI nella sua inattivazione, in altri esperimenti è stato utilizzato uno specifico agente ossidante tiolico, la diammid. L'incubazione di cellule LLC-PK1 con 250 μM di diammid determina una diminuzione dell'attività di cRI dovuta non solo alla sua inattivazione ma anche a una diminuzione della quantità di proteina. Questi risultati dimostrano che l'ossidazione dei gruppi tiolici è sufficiente per l'inattivazione e la degradazione di cRI. Le condizioni usate nell'esperimento non generano un danno cellulare irreversibile né intaccano i livelli di mRNA codificante cRI: è stato osservato, infatti, che se le cellule sono trattate con diammid per 40 minuti e poi incubate nel solo mezzo di coltura per 24 ore, l'attività di cRI e la quantità di proteina tornano a livelli normali (M. Blazquez et al 1996).

Altri studiosi (S. Wang & H. Li 2005) hanno indagato sull'attività antiossidante *in vitro* dell'Inibitore di Ribonucleasi estratto da placenta bovina (cpRI); in questo caso una tecnica di chemiluminescenza è stata utilizzata per determinare l'attività di *scavenger* di radicali liberi di cRI nei confronti di diverse specie reattive dell'ossigeno, come l'anione superossido ($O_2^{\bullet-}$), il radicale idrossilico (OH^{\bullet}), radicali derivanti da lipidi (R^{\bullet}), ed ossigeno singoletto (1O_2). Nel sistema di indagine utilizzato, l'intensità del segnale chemiluminescente è proporzionale alla concentrazione di superossido (prodotto dall'autossidazione del pirogallolo), alla concentrazione del radicale ossidrilico (prodotto con la reazione di Fenton, effettuata in una soluzione contenente $FeCl_2$, fenantrolina, Tris-HCl e H_2O_2) e alla concentrazione di 1O_2 (generato dalla reazione tra NaClO e

H₂O₂). Questi radicali, infatti, possono ossidare il luminolo producendo un segnale chemioluminescente (CL) forte. Per valutare, invece, gli effetti di cRI contro i danni indotti da perossido di idrogeno sui lipidi è stata utilizzata la reazione tra un particolare acido grasso polinsaturo (primrose oil system) e H₂O₂ che produce un segnale CL indipendente dal luminolo. L'effetto anti-ossidante di cRI è quindi valutato misurando l'inibizione del segnale chemioluminescente. Confrontando i valori di EC₅₀ (concentrazione che inibisce il 50% dell'intensità del segnale CL) ottenuti negli esperimenti si può constatare che l'Inibitore è un antiossidante piuttosto forte (contrasta efficacemente tutte le specie reattive descritte in precedenza), risultando in tale attività molto più efficace dei polifenoli del tè.

Un lavoro più recente ha dimostrato il possibile ruolo di cRI nelle difese dallo stress ossidativo, utilizzando una strategia diversa, cioè saggiando l'effetto di agenti ossidanti e antiossidanti su cellule normali e tumorali prima e dopo il silenziamento del gene codificante l'Inibitore (D.M. Monti et al. 2007). In questo studio le cellule HeLa sono state trattate con un agente ossidante, il dietilmaleato (DEM), responsabile della deplezione del glutathione poiché induce la formazione di un complesso glutathione/DEM in presenza dell'enzima glutathione transferasi. Come è noto il glutathione è un tripeptide antiossidante che si comporta da donatore di elettroni: nella forma ridotta (GSH) è capace di donare equivalenti riducenti a molecole instabili come le specie reattive dell'ossigeno passando ad uno stato ossidato e può essere riconvertito nella forma ridotta grazie all'enzima glutathione reductasi. Dunque, se il DEM forma un complesso con il GSH ne abbassa i livelli e induce indirettamente uno stress ossidativo. La presenza di cRI nei lisati cellulari di HeLa è stata saggiata con anticorpi anti-cRI e la sua attività

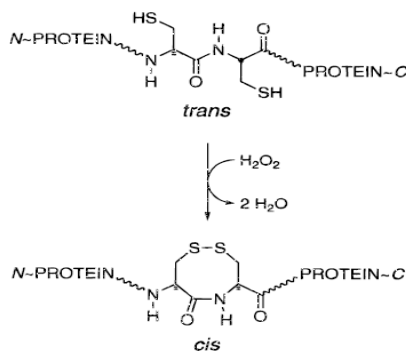
attraverso la capacità di legame ad una resina con RNasi A-Sefarosio. Nelle cellule non trattate con DEM, cRI risulta totalmente legato alla resina, mentre nelle cellule trattate è stata osservata una diminuzione del legame alla resina dipendente dalla concentrazione di DEM. Questo risultato indica che uno stress ossidativo, prodotto in questo caso da un agente che riduce la concentrazione di GSH, risulta in una ossidazione di cRI che non è più in grado di legarsi alla resina RNasi A-Sefarosio.

Per avere un'ulteriore prova che cRI partecipa al *pool* delle difese antiossidanti come gli altri composti tiolici, sono stati osservati, su cellule tumorali HeLa o normali HUVE nelle quali cRI è stato silenziato, gli effetti del trattamento con agenti ossidanti. La prima conseguenza dell'assenza di cRI è una diminuzione dei livelli di GSH e di altri composti tiolici, a dimostrazione che la mancanza di cRI altera l'equilibrio redox cellulare. Se poi si effettua un trattamento con DEM, nelle cellule HeLa in cui cRI è assente vi è una riduzione ancor più drastica dei livelli di GSH e si riscontrano marcati danni al DNA. Nelle cellule HUVE la risposta al DEM è del tutto simile e inoltre l'evidenza che in cellule HUVE non trattate vi siano alti livelli di Inibitore ma bassi livelli di GSH suggerisce che nelle cellule ci sia un *pool* di composti tiolici bilanciato.

Questi risultati suggeriscono fortemente che cRI abbia un ruolo di *scavenger* dello stress ossidativo e che sia coinvolto nell'omeostasi redox cellulare.

Sono stati condotti poi studi con l'obiettivo di creare varianti di cRI con alta affinità di legame per l'RNasi A ma resistenti all'ossidazione (Byung-Moon Kim et al 1998). Nel corso di questi studi sono state prese in esame 2 coppie di cisteine adiacenti, Cys 94 e Cys 95 (localizzate in un loop) e Cys 328 e

Cys 329 (localizzate in una α -elica), che sembrano coinvolte nel processo di ossidazione. Sostituendo le Cys 328 e 329 di hRI con residui di alanina diminuisce l'affinità di legame per l'RNasi A ed aumenta la resistenza all'ossidazione. La stessa sostituzione sulle Cys 94 e 95 comporta una perdita di affinità più drastica e una ridotta resistenza all'ossidazione. I ricercatori Moon Kim, Schultz e Raines hanno cercato di comprendere quale fosse il possibile ruolo delle Cys 328 e 329 nell'innescare la reazione cooperativa di inattivazione di cRI: quando due residui cisteinici adiacenti formano un ponte disolfurico, il risultato è la formazione di un anello a 8 atomi che ha un legame peptidico. In soluzione, il legame peptidico tra 2 cisteine adiacenti appare in equilibrio tra la conformazione *trans* e *cis*.



Normalmente, un legame peptidico in *trans* è dal punto di vista energetico più favorevole. Dal momento che un legame peptidico in *cis* non è tollerato in una α -elica, ed è questo il caso delle Cys 328 e 329, il passaggio del legame peptidico dalla conformazione *trans* a quella *cis* distorce la struttura nativa della proteina cRI e causa un cambiamento conformazionale che aumenta la sensibilità degli altri residui cisteinici ad ulteriori ossidazioni.

SCOPO DELLA TESI

Molti studi sull'Inibitore di Ribonucleasi sono volti a definire il suo ruolo biologico. Tali studi sono focalizzati sia su un possibile ruolo nella difesa dell'RNA cellulare contro RNasi citotossiche che nella regolazione dell'omeostasi redox cellulare. Nella mia tesi ho focalizzato l'attenzione su un aspetto ancora poco chiaro che riguarda l'interazione di cRI con proteine intracellulari: l'identificazione di possibili interattori potrebbe dare un contributo importante alla comprensione della reale funzione di cRI. A tal scopo ho utilizzato diverse strategie:

- esperimenti di coimmunoprecipitazione, che consentono di identificare il pattern di proteine che legano cRI nelle condizioni sperimentali del saggio
- analisi mediante immunofluorescenza, per chiarire se le interazioni identificate negli esperimenti di coimmunoprecipitazione possono essere visualizzate anche nella cellula intatta.

Una volta individuata l'actina come interattore di cRI, il passo successivo è stato quello di saggiare il legame di cRI all'actina in presenza o in assenza di riducenti per verificare se, come per l'interazione con le RNasi, anche per l'interazione con actina fosse necessario lo stato ridotto delle cisteine dell'Inibitore.

Ho anche sottoposto cellule HeLa a trattamenti con agenti ossidanti che promuovono ossidazione di tioli con meccanismi diversi per valutare se l'Inibitore, al pari di molte proteine identificate per coimmunoprecipitazione, formasse ponti disolfurici intermolecolari in risposta allo stress ossidativo.

MATERIALI E METODI

1) Struttura dei plasmidi utilizzati

La sequenza codificante la proteina cRI umana è stata clonata in 2 vettori: P3xFLAG-CMVTM-7.1 e pCS2 + MT.

Il plasmide P3xFLAG-CMVTM-7.1 è un vettore eucariotico di 4.7 kb che consente alti livelli di espressione in cellule animali, già 24 ore dopo la trasfezione, di proteine ricombinanti alla cui estremità N-terminale è fusa una sequenza di 8 amminoacidi ripetuta tre volte (3xFlag). Il “Flag” è un epitopo riconosciuto con alta specificità e sensibilità da anticorpi monoclonali anti-Flag (Sigma) che consentono la rivelazione e l’immunoprecipitazione della proteina ricombinante.

Tale vettore possiede le seguenti caratteristiche: promotore CMV del citomegalovirus che permette una elevata espressione della proteina il cui gene è stato inserito nel sito multiplo di clonaggio, segnale di poliadenilazione che aumenta l’emivita dell’mRNA codificante il gene di interesse, origine di replicazione pBR322 per la duplicazione in E.coli, origine di replicazione di SV40, gene per la resistenza all’ampicillina, sito di taglio per l’enterochinasi al fine di eliminare il Flag dalla proteina di fusione.

La proteina cRI espressa in cellule HeLa trasfettate con il plasmide ricombinante p3xFlag-cRI, sarà indicata nel testo come Flag-cRI.

Il plasmide pCS2 + MT è un vettore di 4352 bp che consente alti livelli espressione in cellule eucariotiche, già 24 ore dopo la trasfezione, di proteine ricombinanti alla cui estremità N-terminale è fuso l’epitopo 6xMyc

ricosciuto con alta specificità e sensibilità da anticorpi monoclonali anti-Myc (Sigma).

Questo plasmide ha le seguenti caratteristiche: promotore CMV del citomegalovirus che permette un'elevata espressione della proteina il cui gene è stato inserito nel sito multiplo di clonaggio, origine di replicazione pBR322 per la duplicazione in E.coli, origine di replicazione di SV40, gene per la resistenza all'ampicillina, segnale di poliadenilazione che aumenta l'emivita dell'mRNA codificante il gene di interesse.

La proteina cRI espressa in cellule HeLa trasfettate con il plasmide ricombinate pCS2+MT-cRI, sarà indicata nel testo come Myc-cRI.

2) *Culture cellulari e trasfezione in cellule eucariotiche*

Le cellule con cui ho lavorato sono cellule eucariotiche HeLa, una linea cellulare tumorale isolata da un cancro della cervice uterina. Queste cellule sono coltivate in un terreno di coltura DMEM (Dulbecco's modified Eagles's medium-Sigma) supplementato con siero fetale bovino al 10% (Sigma), con penicillina-streptomina (Sigma) ed L-glutammina (Sigma) e sarà così definito "completo". Le condizioni di crescita ottimali sono: 37°C e 5 % di CO₂.

Per quanto concerne la *trasfezione* (il processo di introduzione di DNA esogeno in cellule eucariotiche) negli esperimenti da me effettuati è stato usato un sistema di veicolazione mediata dai liposomi: Il liposoma è una vescicola fosfolipidica di dimensione variabile , 25 nm-1µm di diametro, che porta una carica netta positiva; la testa cationica del composto lipidico si associa ai gruppi fosfato negativi dell'acido nucleico e il complesso lipide - DNA si fonde con le membrane cellulari rilasciando spontaneamente il

contenuto nelle cellule. Il composto da me utilizzato è il METAFECTENE PRO (Biontex) che ha la caratteristica di non essere inibito dal siero e di permettere l'entrata di materiale genetico nella cellula, in modo da prevenire effetti tossici. Per la trasfezione di cellule HeLa ho piastrato $2,5 \times 10^6$ cellule in piastre da 100mm. Dopo un'incubazione di 24 ore a 37°C e in 5% CO₂ si effettua la trasfezione in condizioni che sono state in precedenza messe a punto: si aggiungono al terreno 42 µl di Metafectene in 700 µl di PBS (Phosphate Buffered Saline: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.9 mM KH₂PO₄) e 10 µg di plasmide in 700 µl di PBS. Le cellule sono lasciate per 5 ore nell'incubatore, poi si cambia il terreno, per eliminare il Metafectene presente ancora nel terreno e si lascia in incubazione 12-16 ore al fine di ottenere un'espressione ottimale delle proteine.

3) Preparazione di lisati cellulari

24 ore dopo la trasfezione, le cellule sono lisate in condizioni non denaturanti: si procede rimuovendo il terreno DMEM completo dalle piastre di 100mm ed effettuando un lavaggio con 10 ml di PBS. Le cellule vengono, poi, staccate dal fondo utilizzando 500 µl di una soluzione non enzimatica (Cell dissociation non enzymatic solution- Sigma). Dopo un'incubazione a 37°C per 5 min, le cellule si risospendono in 10 ml di terreno DMEM completo. Si centrifuga a 1500rpm per 5min e, dopo un lavaggio con PBS e ulteriore centrifugazione, si risospinge il pellet ottenuto in 500 µl di tampone di lisi (PBS, 1% NP-40, inibitori di proteasi e fosfatasi- Roche). Successivamente si effettua un'incubazione in ghiaccio per 30 min agitando su vortex ogni 5 min per favorire la lisi delle cellule e,

infine, si centrifuga a 12000 rpm per 30 min a 4°C. Il surnatante ottenuto rappresenta l'estratto proteico che va conservato a -80°C.

Il metodo utilizzato per la determinazione della concentrazione delle proteine è il saggio spettrofotometrico Bio-Rad che sfrutta la capacità del colorante Blu Comassie di legare le proteine modificando il loro picco di assorbanza da 465 a 595 nm.

4) Coimmunoprecipitazione

La tecnica della coimmunoprecipitazione permette di evidenziare interazioni tra due o più proteine: infatti, molte delle associazioni proteina-proteina che esistono all'interno della cellula rimangono intatte quando una cellula è lisata in condizioni non denaturanti; pertanto, se una proteina X è immunoprecipitata, anche la proteina Y, che è stabilmente associata ad X, può precipitare. Questa metodica è stata utilizzata proprio per identificare eventuali proteine interagenti con Flag-cRI. Nei miei esperimenti di coimmunoprecipitazione ho utilizzato due diversi approcci che sono di seguito descritti:

- Coimmunoprecipitazione mediante una resina detta *M2 Anti-Flag Affinity Gel*, costituita da un anticorpo monoclonale legato ad un supporto insolubile di agarosio e usata per la purificazione di proteine contenenti l'epitopo "Flag".
- Coimmunoprecipitazione mediante una resina detta *Proteina G - Sepharose* (Santa Cruz) in cui la Proteina G è coniugata alla resina ed è in grado di catturare il complesso antigene – anticorpo perché lega la porzione Fc dell'anticorpo.

- Nel primo caso 20 μ l di resina vengono incubati per 16-20 ore in agitazione rotante a 20°C con 600 μ g di estratti proteici contenuti in un volume di 500 μ l di un tampone per la coimmunoprecipitazione (PBS, 0.5% NP-40, inibitori di fosfatasi e proteasi). Al termine di tale incubazione si centrifuga la resina a 6000xg per 2 minuti a 20°C per eliminare ciò che non si è legato e si effettuano 4 lavaggi con 500 μ l di un tampone di lavaggio (PBS, 0.1% NP-40). Per eluire le proteine dalla resina ho utilizzato due metodi: eluizione con 20 μ l di tampone di caricamento di Laemmli 2x mediante bollitura a 100°C per 5 minuti, che denatura le proteine legate agli anticorpi e ne consente il distacco; oppure eluizione mediante l'uso di un competitore delle proteine contenenti l'epitopo Flag, ovvero il peptide 3xFlag. Tale peptide, legando gli anticorpi anti-Flag, permette il distacco delle proteine specificamente legate per competizione. Quest'ultimo metodo, anche se più specifico, è meno sensibile del primo, per tale motivo si è deciso di accumulare il prodotto delle eluizioni provenienti da più aliquote di resina, utilizzando una stessa soluzione contenente 150 μ g di peptide Flag. Questo è stato possibile dato che la quantità di peptide Flag per ogni prova è in eccesso rispetto alla quantità massima di proteina contenente il Flag legato alla resina. In questo caso gli eluati sono stati analizzati mediante SDS-PAGE, western blotting e spettrometria di massa.
- Nel secondo caso 600 μ g del campione da analizzare sono addizionati ad un tampone per la coimmunoprecipitazione (PBS, 0.5% NP-40, inibitori di proteasi e inibitori di fosfatasi) per un volume finale di 500 μ l. In più si aggiungono ad ogni campione 600 ng di anticorpo anti-actina (Sigma) e si lascia incubare in agitazione rotante per un'ora a 20°C, per consentire agli anticorpi di poter legare l'antigene presente negli estratti proteici. Infine, si

aggiunge ciascun campione a 15 μ l di resina e si incuba per 16-20 ore a 20°C in agitazione rotante. Al termine di tale incubazione vengono effettuati 5 lavaggi con 400 μ l di un tampone di lavaggio (PBS, 0.1% NP-40), per eliminare ciò che non si è legato alla resina e infine si eluisce con 15 μ l di tampone di caricamento di Laemmli 2x tramite bollitura a 100°C per 5 minuti. Gli eluati sono stati, poi analizzati, mediante western blotting utilizzando anticorpi anti-Flag e anticorpi anti-actina.

5) *Analisi citologica di cellule HeLa mediante immunofluorescenza*

Un'analisi di immunofluorescenza è stata condotta mediante microscopia confocale per verificare la localizzazione di cRI e di altre proteine interagenti con l'Inibitore identificate in coimmunoprecipitazione, come l'actina: per questi esperimenti monostrati sub-confluenti di cellule HeLa trasfettate o non trasfettate, piastrate su vetrini copri-oggetto, sono state fissate con 4% formaldeide, permeabilizzate con 0.1% Triton X-100, e successivamente incubate a seconda dei casi con falloidina, con anticorpi anti-Flag (Sigma), anti-cRI ed anti-tubulina (coniugati tutti con un opportuno fluorocromo) e con DRAQ5 (Biostatus). Le cellule sono state lavate e montate su vetrini porta-oggetti con una soluzione contenente 50% glicerolo prima dell'osservazione al microscopio confocale.

6) *Preparazione di estratti nucleari e citoplasmatici*

Poiché l'analisi per immunofluorescenza ha evidenziato la presenza di cRI all'interno dei nuclei di cellule HeLa, sono stati preparati estratti nucleari e citoplasmatici, al fine di identificare cRI nel nucleo.

Per questo scopo $5-6 \times 10^6$ cellule HeLa vengono staccate dal fondo di una piastra da 100mm utilizzando 500 μ l di una soluzione non enzimatica (Cell dissociation non enzymatic solution- Sigma) e risospese in 10 mL di PBS. Si centrifuga a 1500rpm per 5min e, dopo un lavaggio con PBS e ulteriore centrifugazione, si risospende il pellet di cellule ottenuto in 600 μ l di un tampone (30 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 20% glicerolo, DTT 0.5 mM, 1% Triton X-100, inibitori di proteasi e fosfatasi). Successivamente si effettua un'incubazione in ghiaccio per 10 min. Si centrifuga a 3000 rpm, 4°C per 2 min. Si preleva e si conserva il surnatante (che contiene proteine citosoliche) a -80 ° C e si risospende il pellet di nuclei in 500 μ l di un altro tampone (30 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 20% glicerolo, DTT 0.5 mM, NaCl 500 mM, inibitori di proteasi e fosfatasi). Si effettua quindi un'incubazione in ghiaccio per 30 min. Si centrifuga a 10000 rpm, 4°C per 5min. Si preleva e si conserva a -80 ° C il surnatante (che contiene proteine nucleari).

Gli estratti così ottenuti sono stati analizzati mediante western blotting utilizzando anticorpi anti-cRI; per confermare la attendibilità della metodica di estrazione vengono utilizzati anche degli anticorpi specifici che riconoscono proteine esclusivamente citosoliche, come la GAPDH, o esclusivamente nucleari, come la PARP-1.

7) Saggio di legame di cRI all'actina

Sono stati allestiti dei saggi “pull-down” in cui Flag-cRI in lisato di cellule HeLa, o parzialmente purificato per cromatografia a scambio anionico, è stato incubato con actina biotinilata legata ad un supporto di affinità in assenza o in presenza dell'agente riducente DTT. In particolare in questo

saggio è stata utilizzata la resina *Ez view Red Streptavidin Affinity Gel* fornita dalla Sigma e costituita da agarosio/streptavidina. La streptavidina è una proteina di 66 kDa isolata da *Streptomyces avidinii* che presenta un'alta affinità per la biotina. L'agarosio/streptavidina è capace di legare una grande varietà di macromolecole coniugate covalentemente alla biotina. Ogni ml di gel lega 0.2-2mg di streptavidina che a sua volta lega circa 10 µg di biotina (nel nostro caso legata all'actina). L'actina da noi utilizzata (Cytoskeleton) è estratta da muscolo scheletrico di coniglio ed è modificata in modo da legare covalentemente un residuo di biotina alla catena laterale di un residuo di lisina presente sulla superficie dell'actina stessa. 20 µl di resina vengono incubati per due ore a 4°C in agitazione rotante con 200 µl di tampone di lisi contenenti 2 µg di actina biotinilata. Dopo l'incubazione, la resina viene centrifugata e lavata con 200 µl di tampone di lisi al fine di eliminare tutto ciò che non si è legato. Successivamente la resina legata all'actina biotinilata viene fatta incubare tutta la notte a 20°C in agitazione rotante con i campioni di cui si vuole saggiare il legame in assenza o in presenza dell'agente riducente DTT. Al termine di tale incubazione vengono effettuati 4 lavaggi con 500 µl di tampone di lisi per eliminare ciò che non si è legato e infine si eluisce con 20 µl di tampone di caricamento di Laemmli 2x. Gli eluati sono analizzati mediante western blotting utilizzando anticorpi anti-Flag ed anti-actina.

8) *Trattamento di cellule HeLa con agenti ossidanti*

Monostrati sub-confluenti di cellule HeLa, trasfettate o non trasfettate, in terreno D-MEM con 0.5 % siero fetale bovino, sono trattati con quattro tipi di agenti ossidanti: il dietilmaleato (DEM), il pirogallolo, la diammid e il

perossido di idrogeno (H_2O_2). Vengono utilizzate concentrazioni diverse per ogni agente ossidante: DEM (20 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM e 500 μM), pirogallolo (10 μM , 20 μM , 40 μM , 60 μM e 80 μM), diammido (0.125 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM e 2 mM), H_2O_2 (0.125 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM e 2 mM). Il trattamento con tali agenti è durato 30 min per pirogallolo, diammido, H_2O_2 , mentre per il DEM è durato 5 ore. Al termine del trattamento è stato effettuato un saggio della vitalità cellulare utilizzando il Trypan Blu, un colorante in grado di colorare selettivamente le cellule morte. Le cellule sono state poi staccate, raccolte e lisate in presenza di 50 mM *N*-etilmaleimide (NEM) che irreversibilmente alchila i gruppi tiolici delle proteine impedendo ulteriori modificazioni ossidative durante il processamento dei campioni. I lisati di cellule HeLa non trasfettate sono stati analizzati mediante western blotting con anticorpi anti-cRI, anti-actina ed anti-glutathione (Millipore) in assenza o in presenza di riducenti, mentre i lisati di cellule HeLa trasfettate sono stati sottoposti a coimmunoprecipitazione anti-Flag e gli eluati sono stati analizzati mediante western blotting con anticorpi anti-Flag, anti-actina ed anti-tubulina in assenza e in presenza di riducenti.

RISULTATI

1) Ricerca di proteine citosoliche interagenti con cRI

Individuare proteine interagenti con cRI è un primo importante passo per poter comprendere il ruolo biologico di questa proteina: a tal fine ho condotto esperimenti di coimmunoprecipitazione utilizzando lisati citosolici di cellule HeLa, precedentemente trasfettate con il vettore ricombinante p3xFlag-cRI o con vettori di controllo. Questo sistema, non essendo al momento disponibili anticorpi diretti contro la proteina endogena, mi ha consentito di immunoprecipitare la proteina cRI e di verificare la presenza di altre proteine interagenti con questa, nelle condizioni del mio esperimento. L'analisi in SDS-PAGE delle proteine coimmunoprecipitate ha mostrato in modo riproducibile la presenza di alcune bande proteiche assenti o presenti in minor quantità nei campioni in cui sono analizzate coimmunoprecipitazioni di controllo (Fig. 3). Il peso molecolare di una delle bande presenti, in modo riproducibile, in maggiore quantità nel materiale coimmunoprecipitato in presenza di Flag-cRI rispetto ai controlli, suggerisce che questa proteina possa essere l'actina: questa banda proteica, infatti, è identificata come actina da anticorpi specifici (Fig. 4).

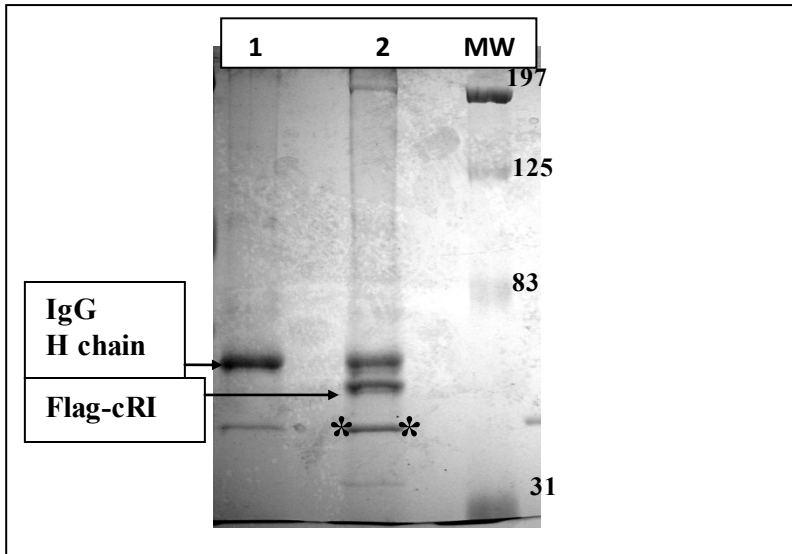


Fig. 3

Analisi in SDS-PAGE 8% delle proteine immunoprecipitate (eluite con il tampone di caricamento Laemmli dalla resina *M2 anti-Flag Affinity Gel*) ottenute da lisati di cellule HeLa trasfettate con p3xFlag-cRI (linea 2) o con il vettore non ricombinante (linea 1). La banda di 43 kDa, intensificata in presenza di cRI, è indicata da asterischi. Colorazione del gel in Blu Comassie.

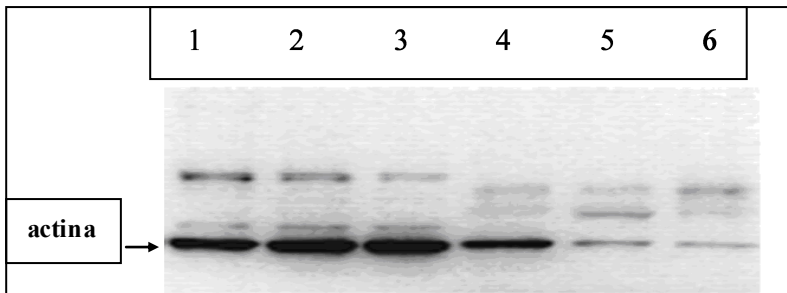


Fig. 4

Analisi in SDS-PAGE 8% e western blotting con anticorpi anti-actina. Lisati di cellule HeLa trasfettate con: p3xFlag-cRI, linea 1; il vettore non ricombinante, linea 2; p3xFlag-BAP esprime la fosfatasi alcalina batterica fusa all'epitopo "3xFlag", linea 3. Nelle linee 4, 5 e 6 sono analizzati i prodotti di immunoprecipitazione (eluiti con il tampone di caricamento Laemmli dalla resina *M2 anti-Flag Affinity Gel*) dei lisati 1, 2 e 3, rispettivamente.

L'actina risulta essere spesso un contaminante in questo tipo di esperimenti, per questo ho provato un metodo di eluizione basato sulla competizione di un peptide specifico (peptide 3xFlag) per il legame con l'anticorpo anti-Flag. In questo modo si determina il distacco delle proteine contenenti l'epitopo Flag, precedentemente legate alla resina. Ho poi analizzato l'eluato in SDS- PAGE ed il risultato, mostrato in Fig. 5a, di nuovo mostra la presenza della proteina di 43 kDa nel coimmunoprecipitato in presenza di Flag-cRI, tale banda non è in questo caso presente nel materiale coimmunoprecipitato da cellule trasfettate con plasmide non ricombinante. Ho ripetuto lo stesso esperimento analizzando il materiale coimmunoprecipitato mediante western blotting con anticorpi anti-actina, lo stesso filtro è stato poi incubato anche con anticorpi anti-Flag (questo ultimo dato non è mostrato). Il risultato conferma l'interazione Flag-cRI-actina già precedentemente osservata (Fig. 5b).

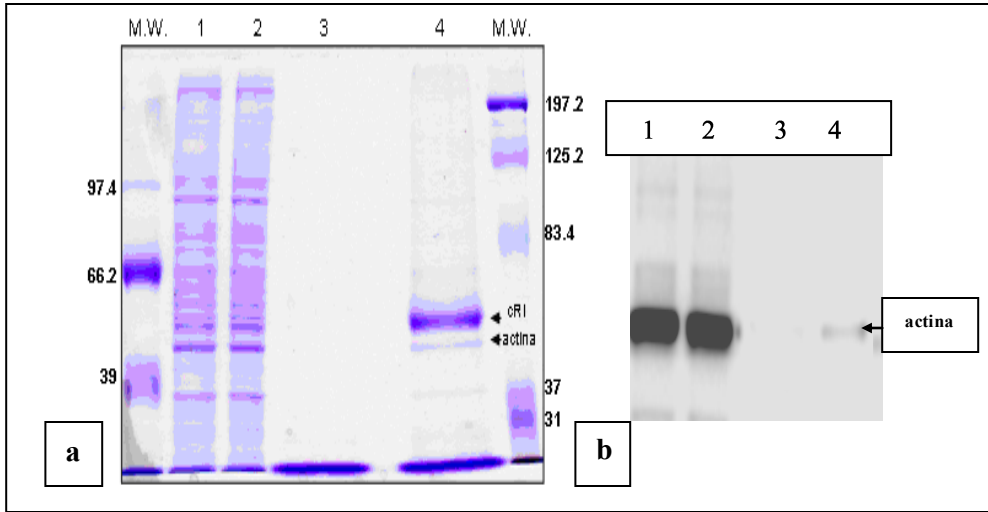


Fig. 5

a - Analisi in SDS-PAGE 8% delle proteine immunoprecipitate (eluite con il peptide 3xFlag dalla resina *M2 anti-Flag Affinity Gel*) ottenute da lisati di cellule HeLa trasfettate con p3xFlag-cRI (linea 4) o con il vettore non ricombinante (linea 3). Nelle linee 1 e 2 sono analizzati 7 μ g dei lisati cellulari usati nell'esperimento. La banda di 43 kDa corrisponde ad actina. Colorazione del gel in Blu Comassie.

b - Analisi in SDS-PAGE 8% e western blotting con anticorpi anti-actina. Lisati di cellule HeLa trasfettate con: il vettore non ricombinante, linea 1; p3xFlag-cRI, linea 2. Nelle linee 3 e 4 sono analizzati i prodotti di immunoprecipitazione (eluiti con il peptide 3xFlag dalla resina *M2 anti-Flag Affinity Gel*) dei lisati 1 e 2 rispettivamente.

Un'ulteriore prova della interazione fra le due proteine è data dal risultato di esperimenti di coimmunoprecipitazione in cui il lisato cellulare è stato incubato in presenza di anticorpi anti-actina. Ho isolato le proteine interagenti mediante il legame degli anticorpi alla proteina G coniugata ad agarosio e dopo averle separate in SDS-PAGE ho effettuato in seguito analisi di western blotting, utilizzando come sonda anticorpi anti-Flag per identificare Flag-cRI (Fig. 6a) o anticorpi anti-actina (Fig. 6b).

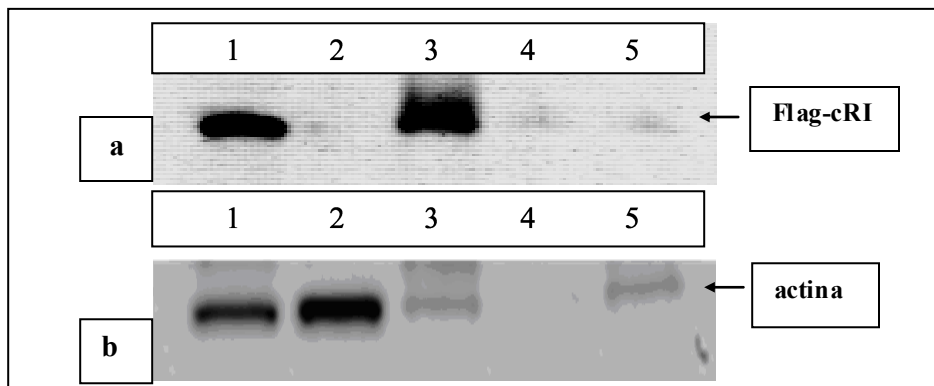


Fig. 6.

Analisi in SDS-PAGE 8% e western blotting.
a - Lisati di cellule HeLa trasfettate con: p3xFlag-cRI, linea 1; il vettore non ricombinante, linea 2. Nelle linee 3, 4 e 5 sono analizzati con anticorpi anti-Flag i prodotti di immunoprecipitazione (eluiti dalla resina *Proteina G – Sepharose* a cui è legato l'anticorpo anti-actina) del lisato 1 in 3 e 4 (nel campione 4 sono stati omessi gli anticorpi di immunoprecipitazione) e del lisato 2 in 5.

b - Lo stesso filtro è analizzato con anticorpi anti-actina.

È evidente che la proteina Flag-cRI è catturata dalla resina di immunoaffinità solo se sono presenti gli anticorpi anti-actina (Fig. 6a) e quindi l'actina stessa (Fig. 6b), dunque la presenza di Flag-cRI nel materiale immunoprecipitato non è dovuta ad adsorbimento aspecifico. È da notare che gli anticorpi anti-Flag e gli anticorpi anti-actina hanno un'efficienza molto diversa. Nella linea 1 della Fig. 6 nei pannelli a e b è analizzato lo stesso lisato cellulare in cui Flag-cRI corrisponde a circa lo 0.1% delle proteine totali (valore dedotto da esperimenti precedenti per comparazione con la proteina purificata, la cui concentrazione è stata determinata dalla densità ottica della soluzione) mentre l'actina corrisponde a circa il 4%, ma l'intensità relativa delle bande rilevate da western blotting è inversa e si osserva un segnale molto più debole per l'actina.

2) Localizzazione di cRI nella cellula

Gli esperimenti di coimmunoprecipitazione sono solo indicativi delle possibili interazioni tra proteine, ma non è possibile, semplicemente da questi, dedurre con certezza che l'interazione tra proteine in lisati cellulari si verifichi anche nella cellula intatta. Un metodo che può fornire indicazioni sulle interazioni presenti nella cellula è l'analisi citologica per immunofluorescenza al microscopio confocale che consente di localizzare le proteine in esame nell'ambiente cellulare. Ho preparato due diversi costrutti per questo tipo di analisi, in modo da poter usare anticorpi specifici per identificare e localizzare la proteina cRI ricombinante: il plasmide p3xFlag-cRI e il plasmide pCS2+MT-cRI. In quest'ultimo costrutto la proteina ricombinante presenta un peptide aggiuntivo riconosciuto da anticorpi anti-Myc. L'analisi è stata effettuata su cellule HeLa trasfettate con i plasmidi ricombinanti p3xFlag-cRI o con vettori di controllo. L'Inibitore ricombinante, essendo gli anticorpi primari monoclonali di topo, è rilevato per immunofluorescenza indiretta da anticorpi secondari anti-IgG di topo, legati a fluoresceina, mentre i filamenti di actina sono rilevati da falloidina legata a rodamina. I risultati mostrati in Fig. 7 indicano parziale colocalizzazione di cRI ricombinante e actina particolarmente a livello di alcuni filamenti di actina. Il livello di espressione molto elevato della proteina cRI ricombinante produce, in queste analisi, una fluorescenza diffusa molto intensa nel citoplasma. Questa circostanza lascia il dubbio che si osservi un effetto semplicemente dovuto a sovrapposizione e non ad una vera interazione fra le molecole in esame.

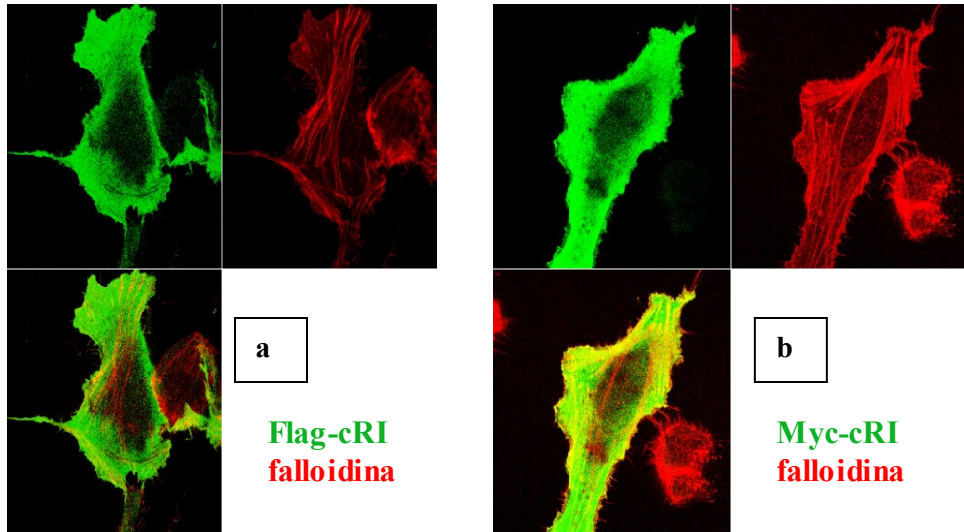


Fig. 7

Analisi di microscopia confocale di cellule HeLa trasfettate con p3xFlag-cRI in a, o pCS2+MT-cRI in b, trattate con anticorpi diretti contro il peptide Flag o contro un epitopo della proteina myc, rispettivamente e con anticorpi secondari legati a fluoresceina. I filamenti di actina sono rilevati da falloidina legata a rodamina.

A questo punto del mio studio, ho avuto la disponibilità di anticorpi diretti contro cRI umano purificato (una frazione purificata di IgG policlonali di coniglio) e ne ho saggiato la specificità mediante analisi di western blotting (Fig. 8).

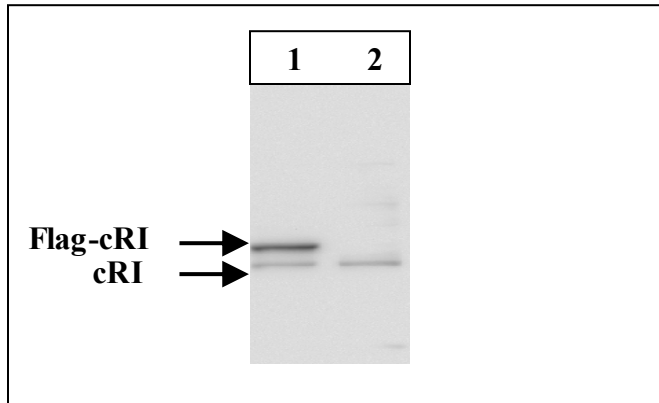


Fig. 8

Analisi in SDS-PAGE 10% e western blotting con anticorpi anti-cRI di lisati di cellule HeLa trasfettate con: p3xFlag-cRI, linea 1, o con il vettore non ricombinante, linea 2.

Utilizzando questi anticorpi l'analisi al microscopio confocale consente dunque di localizzare la proteina cRI endogena ed i risultati hanno confermato la sua interazione con l'actina (Fig. 9). Osservando la serie di immagini in piani focali successivi si nota la continuità del segnale giallo, che indica colocalizzazione, inoltre è evidente il segnale specifico di cRI all'interno del nucleo.

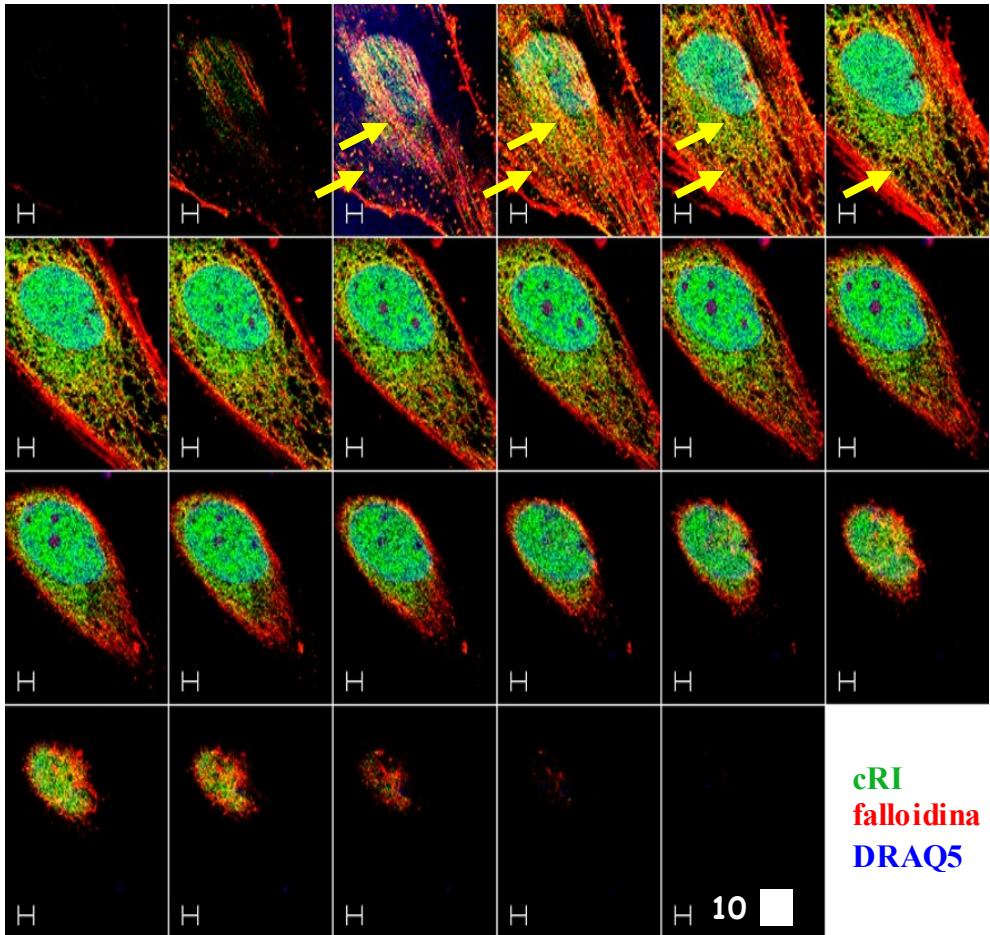


Fig. 9

Analisi di microscopia confocale di cellule HeLa trattate con anticorpi diretti contro la proteina cRI, identificata da anticorpi secondari legati a fluoresceina. I filamenti di actina sono rilevati da falloïdina legata a rodamina, il nucleo da DRAQ5.

Per confermare la localizzazione nel nucleo della proteina cRI, ho esaminato le proteine nucleari mediante western blotting con anticorpi anti-cRI. Il risultato (Fig. 10) mostra che gli anticorpi riconoscono anche fra le proteine estratte dai nuclei una banda del peso molecolare corrispondente a cRI, cioè

conferma che il segnale nucleare osservato nell'analisi al microscopio è dovuto proprio alla presenza di cRI nel nucleo e non ad eventuale interazione aspecifica degli anticorpi.

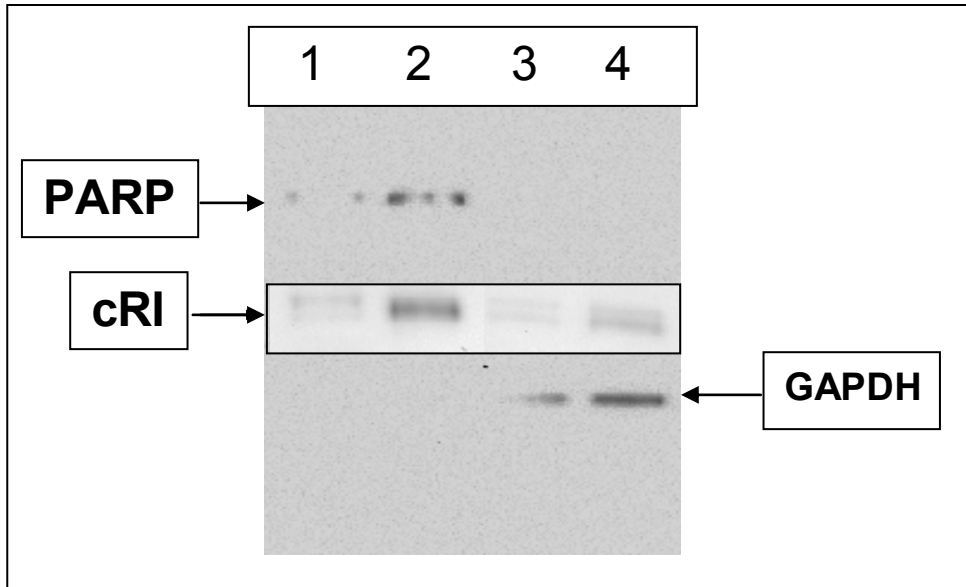


Fig. 10

Analisi in SDS-PAGE 8% e western blotting di estratti nucleari (linee 1,2) e lisati citosolici (linee 3,4) di cellule HeLa. 2,5 µg di proteine sono analizzati nelle linee 1,3 e 5 µg nelle linee 2,4. Nella figura sono mostrati i segnali ottenuti da due analisi parallele: nel riquadro è mostrato il segnale relativo agli anticorpi anti-cRI, nello sfondo sono indicati i segnali generati da anticorpi diretti contro la proteina nucleare PARP o contro l'enzima citosolico GAPDH.

3) *Modulazione del legame actina-cRI in ambiente riducente*

È noto che per l'interazione di cRI con le Ribonucleasi è necessario che l'Inibitore si presenti allo stato ridotto in cui i residui di cisteina si trovano nella forma tiolica. Mi è sembrato dunque necessario confrontare il legame fra l'Inibitore stesso e l'actina in presenza o in assenza di reagenti tiolici per

verificare se anche l'interazione fra queste due proteine sia favorita dallo stato ridotto dei residui di cisteina di cRI. Le condizioni sperimentali che ho finora descritto per i saggi di immunoprecipitazione escludono la presenza di reagenti tiolici per l'evidente motivo di preservare la struttura degli anticorpi. Ho dunque utilizzato un sistema basato su actina biotinilata legata ad un supporto di streptavidina-agarosio. L'interazione Flag-cRI-actina è stata valutata incubando lisati di cellule HeLa esprimenti Flag-cRI (preparati in presenza o assenza di DTT) con il sistema di affinità basato su actina biotinilata in presenza o in assenza e dell'agente riducente DTT. Le proteine interagenti sono state separate in SDS-PAGE ed analizzate mediante western blotting. Il risultato mostra che la presenza di reagenti tiolici non stimola affatto il legame fra le due proteine (Fig. 11). L'analisi con anticorpi anti-actina mostra che il legame actina biotinilata – streptavidina agarosio non è, come prevedibile, modificato in presenza di DTT. Nelle linee 5 e 6 sono analizzati campioni in cui l'actina biotinilata è stata omessa, per valutare l'eventuale adsorbimento aspecifico di Flag-cRI alla resina. Ho ripetuto questo esperimento purificando parzialmente Flag-cRI da lisati di cellule HeLa trasfettate con p3xFlag-cRI, per minimizzare l'interferenza dell'actina endogena del lisato con il legame di Flag-cRI alla resina.

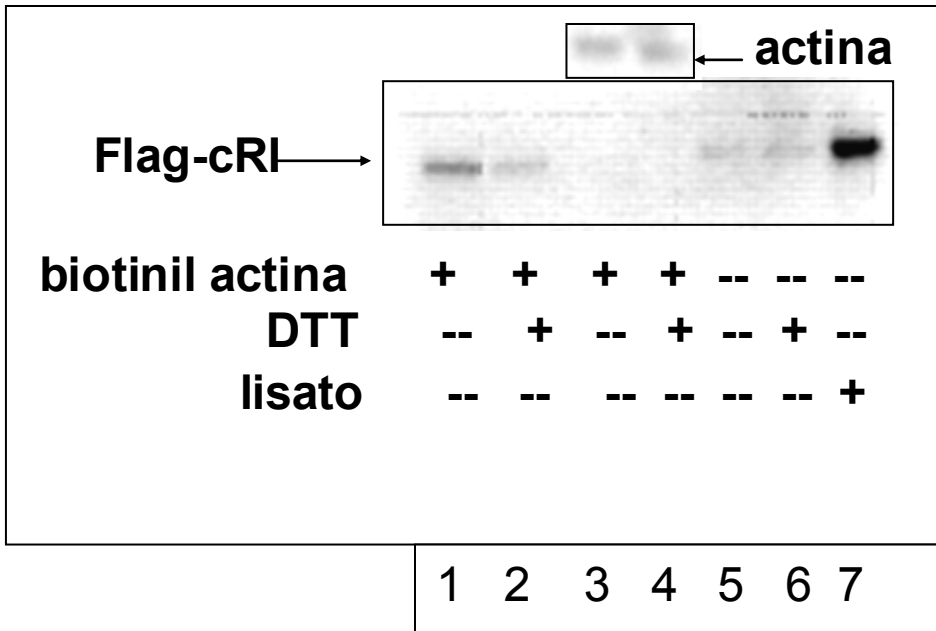


Fig. 11

Analisi in SDS-PAGE 8% e western blotting con anticorpi anti-Flag delle proteine legate al supporto di affinità actina biotinilata-streptavidina agarosio, in assenza (linee 1, 3, 5) o in presenza di DTT (linee 2, 4, 6), nelle linee 3 e 4 non è stato aggiunto lisato, nelle linee 5 e 6 è stata omessa l'actina biotinilata. Nel riquadro superiore è mostrato il segnale, che non varia in presenza o assenza di DTT, derivate da anticorpi anti-actina. I lisati, preparati come indicato nel testo, derivano da cellule HeLa trasfettate con p3xFlag-cRI.

Ho utilizzato una colonna per HPLC a scambio ionico Resource Q, eluita con gradiente di NaCl, ottenendo la separazione mostrata in Fig. 12a ed ho ripetuto l'analisi di interazione con il supporto di affinità basato su actina biotinilata, usando il materiale eluito nella frazione 17 (linea 5 della Fig. 12a). Anche in questo caso Flag-cRI in assenza di agenti riducenti lega maggiormente l'actina (Fig.12b), anche se l'aver eliminato la maggior parte della actina endogena non porta ad aumentare la resa di questa interazione.

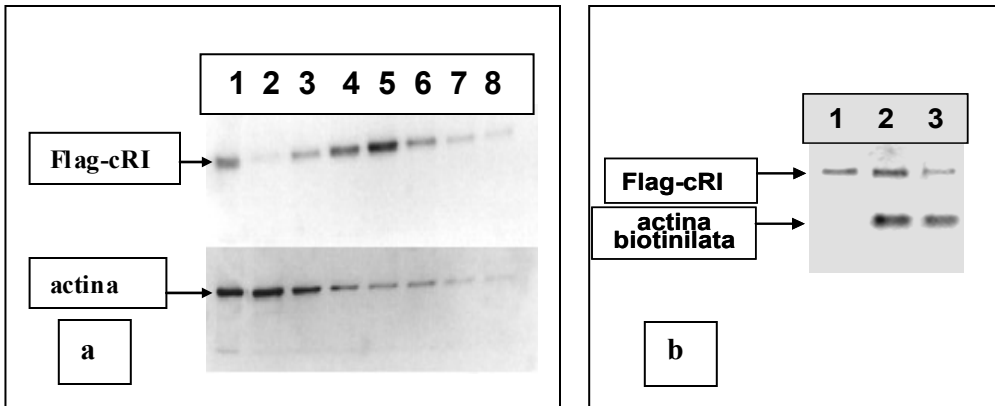


Fig. 12

a - Analisi in SDS-PAGE 8% e western blotting delle frazioni eluite da separazione su colonna a scambio ionico (frazioni alternate 11-23 del gradiente corrispondenti alle linee 2-8), il pannello superiore è analizzato con anticorpi anti-Flag, il pannello inferiore con anticorpi anti-actina.

b - Analisi in SDS-PAGE 8% e western blotting delle proteine legate al supporto di affinità actina biotinilata-streptavidina agarosio, in assenza (linea 2) o in presenza di DTT (linea 3), il pannello superiore è analizzato con anticorpi anti-Flag, il pannello inferiore con anticorpi anti-actina, e nella linea 1 è analizzata la frazione 17 usata nei campioni 2 e 3.

4) *Identificazione di altre proteine coimmunoprecipitate con cRI*

Oltre all'actina diverse altre bande proteiche sono visualizzabili nelle analisi di immunoprecipitazione (Fig. 3), le principali sono state identificate mediante spettrometria di massa, riportate in Tabella 1. Tutte le proteine identificate, tranne l'actina, sono specificamente presenti nei campioni coimmunoprecipitati di cellule HeLa trasfettate con p3xFlag-cRI e non in quelli di cellule trasfettate con il vettore non ricombinante.

Risultati

CODE	PROTEIN	CYS	GS	PS-SP
P78527	DNA dependent protein kinase catalytic domain	+	+	
Q14204	Dynein 1 Heavy chain1			
P21333	Filamin			
Q7Z6Z7	E3 Ubiquitin Protein Ligase HUWE1	+		
P27708	Glutamine dependent carbamoyl phosphate synthase	+		
Q92616	Translational Activator GCN1			
P35579	Myosin	+	+	+
P49327	Fatty Acid synthase			+
Q13085	AcetylCoA carboxylase			
Q8TEM1	Nuclear pore membrane glycoprotein 210			
Q93008	Ubiquitin Carboxyterminal hydrolase			
P11142	Heat shock cognate protein 71kDa	+	+	+
Q15758	Neutral Amino Acid transporter B	+		
P68371	Tubulin beta	+	+	+
P25705	ATP synthase sub. Alpha			+
Q9Y230	Ruv B-like 1			
P49411	Elongation factor Tu			+
P60709	actin	+	+	+
gi8393418	GAPDH	+	+	+
P23396	40S Ribosomal Protein S3			
P05141	ADP/ATP Translocase 2			+

Tabella 1

Elenco degli interattori di Flag-cRI identificati mediante spettrometria di massa. Sono indicate le proteine che possiedono cisteine reattive (CYS), che subiscono S-glutathionilazione (GS) e quelle che possono formare ponti disolfurici intermolecolari.

Fra queste sono presenti molte proteine associate al citoscheletro, quali actina, tubulina, filamina, dineina e la catena pesante della miosina non muscolare II-a. Sono presenti inoltre altre proteine fra cui una proteina associata al trasporto nucleare: la glicoproteina di membrana di 210 kDa dei pori nucleari. Molte di queste proteine sono caratterizzate dalla presenza di

residui di cisteina reattivi che possono subire modificazioni ossidative e formare ponti disolfurici intermolecolari sia con il glutathione che con altre proteine (C. Lind et al 2002). Allo scopo di valutare se cRI possa interagire nella cellula intatta anche con altre proteine, ho effettuato ulteriori indagini sulla interazione con la tubulina mediante analisi citologica di immunofluorescenza: in questo caso cRI endogeno e α -tubulina sono rilevati per immunofluorescenza indiretta da anticorpi legati a fluoresceina (emissione nel verde per cRI, nel rosso per la tubulina) come mostrato nella Fig. 13.

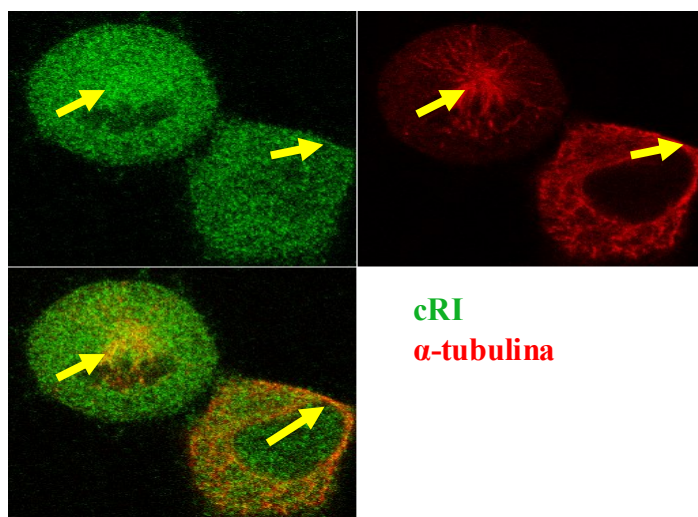


Fig. 13
Analisi citologica mediante immunofluorescenza indiretta di cellule HeLa: cRI e tubulina colocalizzano a livello di zone di sovrapposizione gialle.

L'analisi indica che cRI non solo interagisce con l'actina, ma anche con la tubulina: queste prove suggeriscono l'ipotesi che cRI possa giocare un ruolo nell'organizzazione o comunque nella difesa dallo stress ossidativo del citoscheletro.

5) *Analisi di cRI dopo trattamento di cellule HeLa con agenti ossidanti*

Studi recenti hanno dimostrato che nel citosol le proteine possono subire ossidazione a livello di specifici residui di cisteina e formare ponti disolfurici con altre molecole, quali il glutathione o altre proteine in seguito a stress ossidativi o ad eventi di ossidazione dovuti alla generazione di specie reattive dell'ossigeno implicati in diversi sistemi di trasduzione del segnale. La glutathionilazione può essere rivelata dall'uso di anticorpi specifici in western blotting, quando i campioni sono separati in gel denaturante ma non riducente. In queste stesse condizioni può essere rivelata la formazione di ponti disolfurici fra proteine, evidenziata da una migrazione a pesi molecolari più elevati. Ho deciso dunque di verificare se anche cRI potesse subire tali modifiche in seguito a stress ossidativi. In Fig. 14 è mostrato il risultato dell'analisi con anticorpi anti-glutathione di lisati di cellule HeLa trattate con diammidio, in condizioni che inducono glutathionilazione di proteine cellulari. Il segnale generato da questi anticorpi appare solo dopo trattamento con diammidio e solo se il lisato è analizzato in assenza di reagenti riducenti, indicando che il segnale dipende dalla formazione di ponti disolfurici. In questi esperimenti i lisati cellulari sono preparati in presenza di N-etilmaleimide (NEM) che, reagendo con i tioli liberi, impedisce che si determini la formazione di ponti disolfurici al momento della lisi delle strutture cellulari. L'analisi con anticorpi anti-cRI, su una sezione dello stesso filtro, mostra che il segnale corrispondente a questa proteina resta invariato dopo il trattamento ossidante e che essenzialmente nessuna delle bande a più alto peso molecolare corrisponde ai segnali identificati dall'anticorpo anti-glutathione. Questo risultato ha evidenziato

che cRI non è estensivamente glutationilato in cellule HeLa, né allo stato basale né in condizioni che favoriscono tale legame.

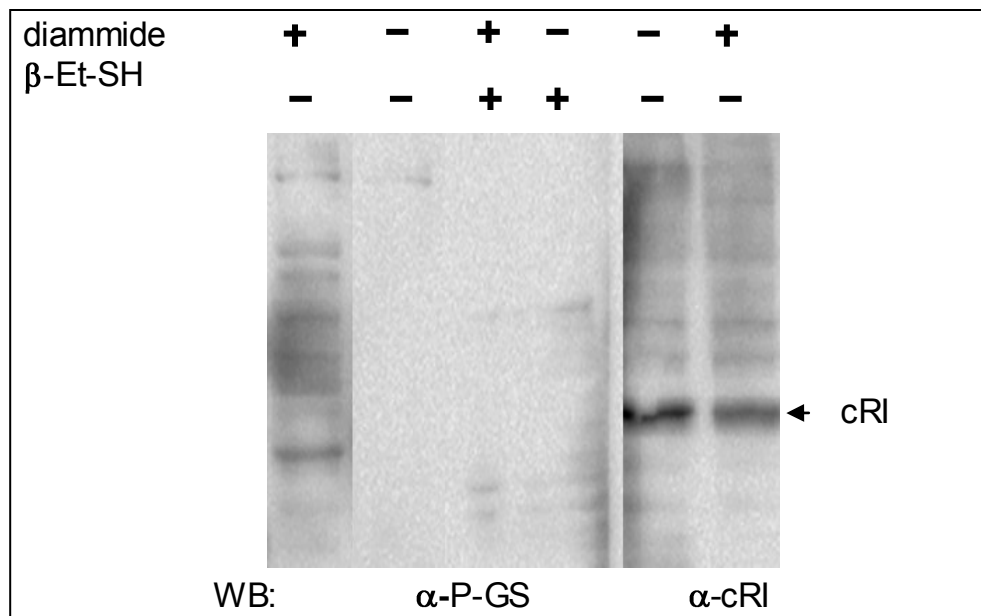
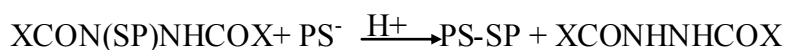
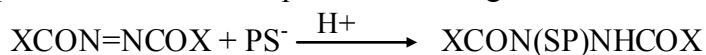


Fig. 14

Analisi in SDS-PAGE 8% e western blotting di estratti di cellule HeLa trattate per 30 min con 0.5 mM diammide (linee 1, 3, 6) o non trattate (linee 2, 4, 5) ed analizzate in assenza (linee 1, 2, 5, 6) o in presenza (linee 3, 4) di β -mercaptoetanol. Le linee 1-4 sono state analizzate con anticorpi anti-glutathione, le linee 5, 6 con anticorpi anti-cRI.

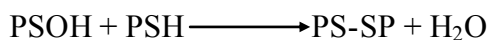
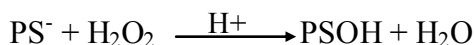
Per identificare l'eventuale formazione di ponti disolfurici fra proteine in condizioni di stress ossidativo, ho analizzato i lisati cellulari mediante western blotting con anticorpi anti-cRI dopo trattamento con quattro diversi agenti ossidanti che differiscono per il meccanismo di azione:

- la diammide promuove la formazione di ponti disolfurici ma non implica nella reazione la presenza di ossigeno.

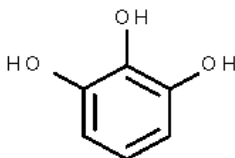


(PS⁻ = proteina con cisteina in forma di tiolato)

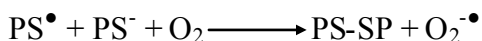
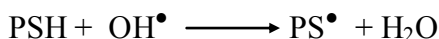
- H₂O₂ reagisce con le cisteine delle proteine in forma di tiolato, dando luogo al prodotto ossidato della cisteina acido sulfenico che è molto reattivo: può reagire con i gruppi sulfidrilici di altre cisteine formando ponti disolfurici.



- il DEM che forma complessi DEM\GSH, in presenza di glutathione transferasi inducendo stress ossidativo indiretto.
- il pirogallolo per autossidazione produce O₂^{•-} una specie radicalica dell'ossigeno che provoca ossidazione *in vitro* di cRI.



O₂^{•-} inoltre induce blocco della crescita in cellule HeLa. Reagendo con H₂O₂, che può derivare da dismutazione dello stesso anione superossido, produce il radicale OH[•], in grado di reagire direttamente con gruppi tiolici, innescando una reazione radicalica:



Di ciascuna sostanza sono state usate concentrazioni scalari, in accordo con quanto riportato in letteratura riguardo gli intervalli di concentrazione che consentono sopravvivenza delle cellule in coltura. Le cellule sono state trattate con diammidio, H₂O₂ e pirogallolo a tempi brevi (30 min) poiché

intendevo monitorare un effetto chimico diretto, mentre ho lasciato agire il DEM per 5 ore considerando che lo stress ossidativo indotto da questa sostanza è secondario alla deplezione del glutatione.

Nei lisati cellulari trattati con diammid e analizzati in assenza di riducenti si osserva la presenza solo di deboli segnali a pesi molecolari superiori a quello di cRI che non sono intensificati da stress ossidativo, questi segnali sono del tutto assenti nei campioni analizzati in assenza di riducenti (Fig. 15). È anche evidente che si osserva un decremento di cRI (Fig. 19a) a concentrazioni alte di diammid, che risultano anche citotossiche come indicato nella Fig. 20a.

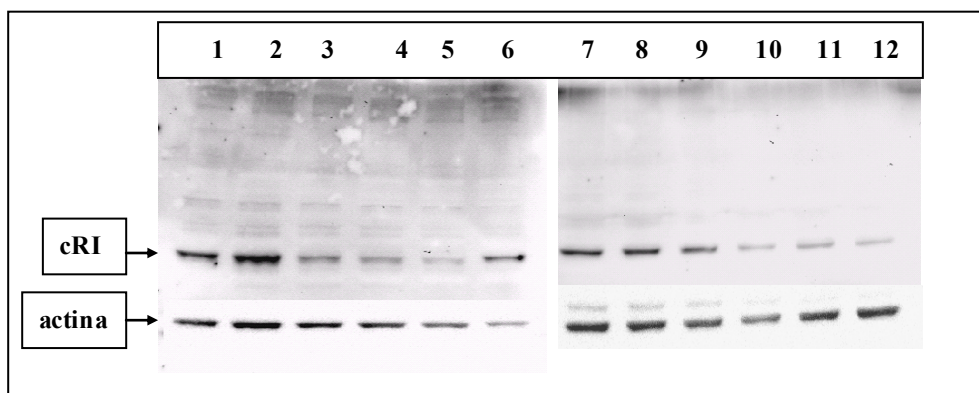


Fig. 15

Analisi in SDS-PAGE 8% e western blotting con anticorpi anti-cRI di estratti di cellule HeLa non trattate (linee 6, 7) o trattate per 30 min con 0.125, 0.25, 0.5, 1 e 2 mM diammid (linee 1-5 e 8-12, rispettivamente) ed analizzate in assenza (linee 1-6) o in presenza (linee 7-12) di β -mercaptoetanolo. I filtri sono stati trattati anche con anticorpi anti-actina come riferimento quantitativo.

In Fig. 16 sono mostrati i risultati relativi alle analisi di cellule trattate con concentrazioni crescenti di H_2O_2 , con la procedura già descritta. Anche in questo caso si osserva la presenza solo di deboli segnali nelle linee 1-6 a

pesi molecolari superiori a quello di cRI, che non sono intensificati da stress ossidativo, questi segnali sono del tutto assenti nelle linee 7-12 in cui i campioni sono analizzati in presenza di riducenti. Il decremento di cRI, a concentrazioni alte di H_2O_2 (Fig. 19b) è molto meno evidente rispetto al trattamento con diammidio: le differenze osservate sono più probabilmente dovute a variabilità, poiché le due serie (istogrammi in giallo e in azzurro) rappresentano l'analisi degli stessi lisati. Analogamente la vitalità cellulare è molto meno compromessa da questo reagente (Fig. 20b).

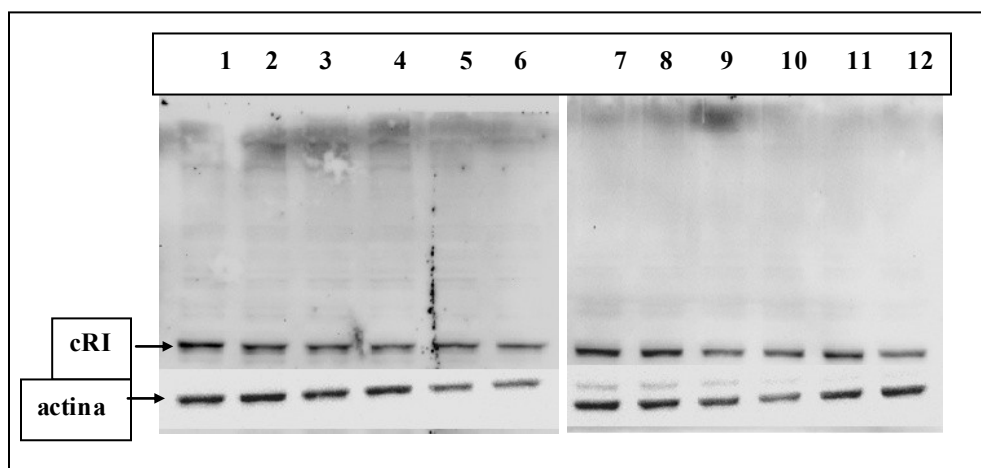


Fig. 16

Analisi in SDS-PAGE 8% e western blotting con anticorpi anti-cRI di estratti di cellule HeLa non trattate (linee 6 e 7) o trattate per 30 min con 0.125, 0.25, 0.5, 1 e 2 mM di H_2O_2 (linee 1-5 e 8-12, rispettivamente) ed analizzate in assenza (linee 1-6) o in presenza (linee 7-12) di β -mercaptoetanolio. I filtri sono stati trattati anche con anticorpi anti-actina come riferimento quantitativo.

In Fig. 17 sono analizzati i lisati di cellule trattate con concentrazioni crescenti di DEM, separati in SDS-PAGE in assenza di riducenti (linee 1-6) per evidenziare eventuali bande a peso molecolare più alto di quello di cRI, o in presenza di agenti riducenti (linee 7-12) per determinare se tali bande risultino sensibili, cioè eliminate, in presenza di reagenti tiolici. Non sono presenti segnali diversi da quello generato da cRI stesso, questo risultato esclude che nelle condizioni sperimentali cRI formi legami disolfurici intermolecolari. Si osserva, comunque, un decremento consistente di cRI quando cellule HeLa sono trattate con alte concentrazioni di DEM (Fig. 19c).

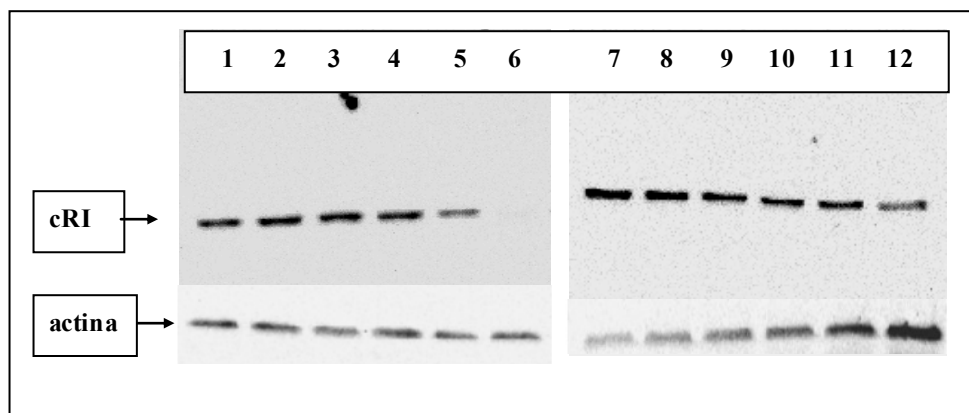


Fig. 17

Analisi in SDS-PAGE 8% e western blotting con anticorpi anti-cRI di estratti di cellule HeLa non trattate (linee 1 e 7) o trattate per 5 ore con 20, 50, 100, 200 e 500 μ M DEM (linee 2-6 e 8-12, rispettivamente) ed analizzate in assenza (linee 1-6) o in presenza (linee 7-12) di β -mercaptoetanolo. I filtri sono stati trattati anche con anticorpi anti-actina come riferimento quantitativo.

Anche l'analisi con pirogallolo ha dato analoghi risultati. In Fig. 18, infatti, sia nei campioni analizzati in assenza che in presenza di riducenti gli anticorpi anti-cRI non identificano che un'unica banda del peso molecolare atteso per questa proteina.

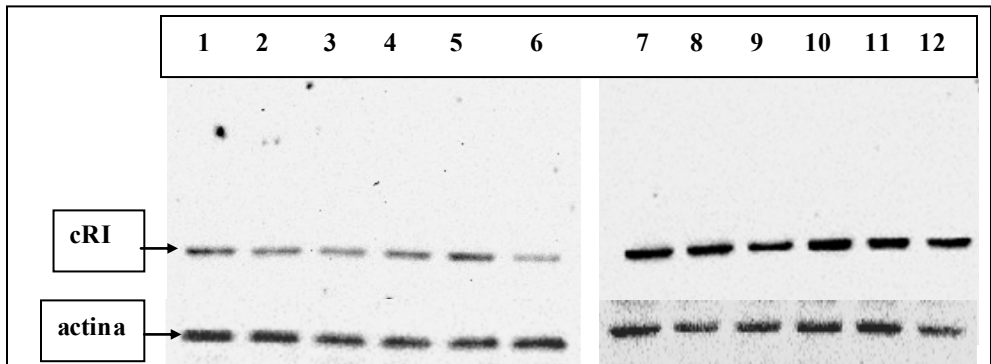


Fig. 18

Analisi in SDS-PAGE 8% e western blotting con anticorpi anti-cRI di estratti di cellule HeLa non trattate (linee 1 e 7) o trattate per 30 min con 10, 20, 40, 60 e 80 μ M pirogallolo (linee 2-6 e 8-12, rispettivamente) ed analizzate in assenza (linee 1-6) o in presenza (linee 7-12) di β -mercaptoetanolo. I filtri sono stati trattati anche con anticorpi anti-actina come riferimento quantitativo.

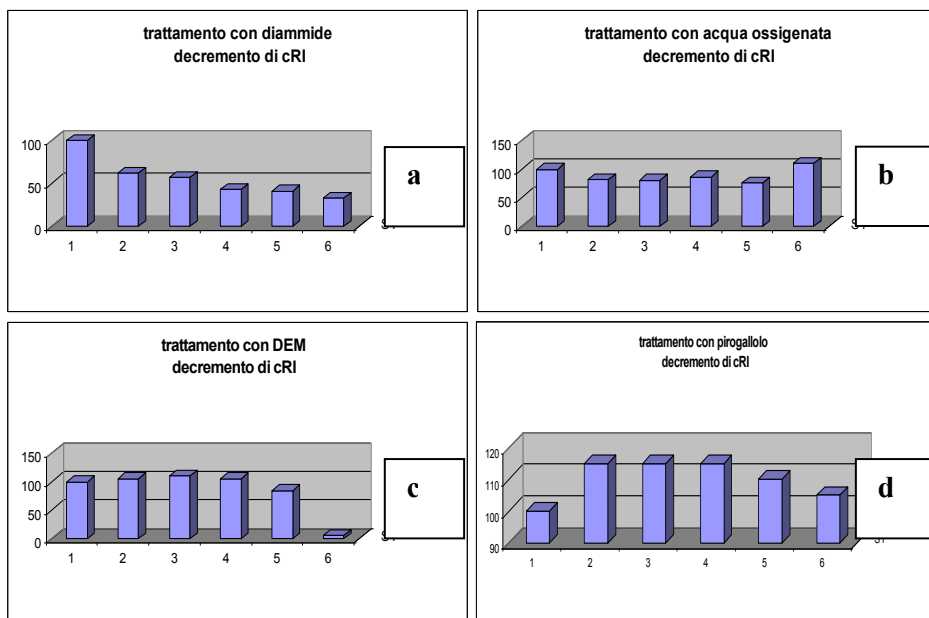


Fig. 19

a – L’istogramma rappresenta il risultato dell’analisi densitometrica del western blotting in Fig. 15 (in azzurro i campioni 1-6 delle Fig.15 analizzati in assenza di riducenti) e mostra il decremento percentuale di cRI, il cui segnale è normalizzato relativamente a quello dell’actina, alle concentrazioni crescenti di diammide relativamente alle cellule non trattate (colonna 1).

b – come in a, riferito alle analisi di western blotting mostrate in figura 16.

c – come in a, riferito alle analisi di western blotting mostrate in figura 17.

d – come in a , riferito alle analisi di western blotting mostrate in figura 18.

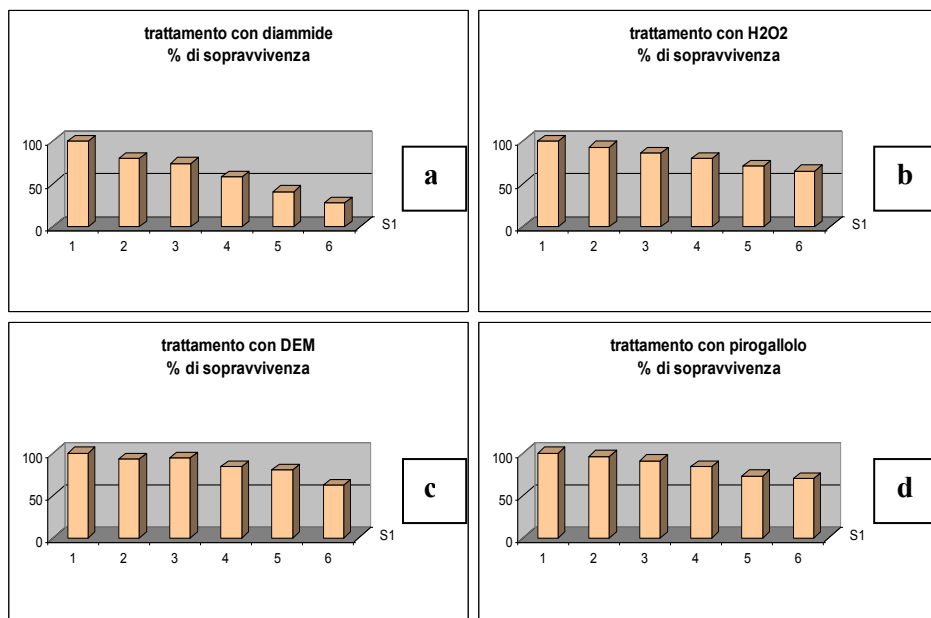


Fig. 20

Gli istogrammi rappresentano il decremento percentuale di cellule vitali alle concentrazioni crescenti di: a– diammide, b- H_2O_2 , c- DEM, d- pirogallolo, relativamente alle cellule non trattate (colonne 1).

Per indagare meglio la possibilità che cRI formi legami disolfurici con le proteine che con esso interagiscono, ho analizzato i prodotti di coimmunoprecipitazione con anticorpi anti-Flag, derivanti da lisati esprimanti Flag-cRI, preparati in presenza di NEM ed separati in SDS-PAGE assenza o in presenza di riducenti ed analizzati con anticorpi anti-Flag per identificare cRI o con anticorpi anti-actina e anti-tubulina, per valutare se nella interazione fra queste proteine possano essere coinvolti legami disolfurici. L'analisi conferma l'interazione fra le proteine anche in queste diverse condizioni sperimentali e rivela che in presenza (dati non mostrati) o in assenza di riducenti, sia allo stato basale che dopo stress

ossidativi, actina e tubulina non stabiliscono ponti disolfurici con cRI (Fig. 21 e Fig. 22).

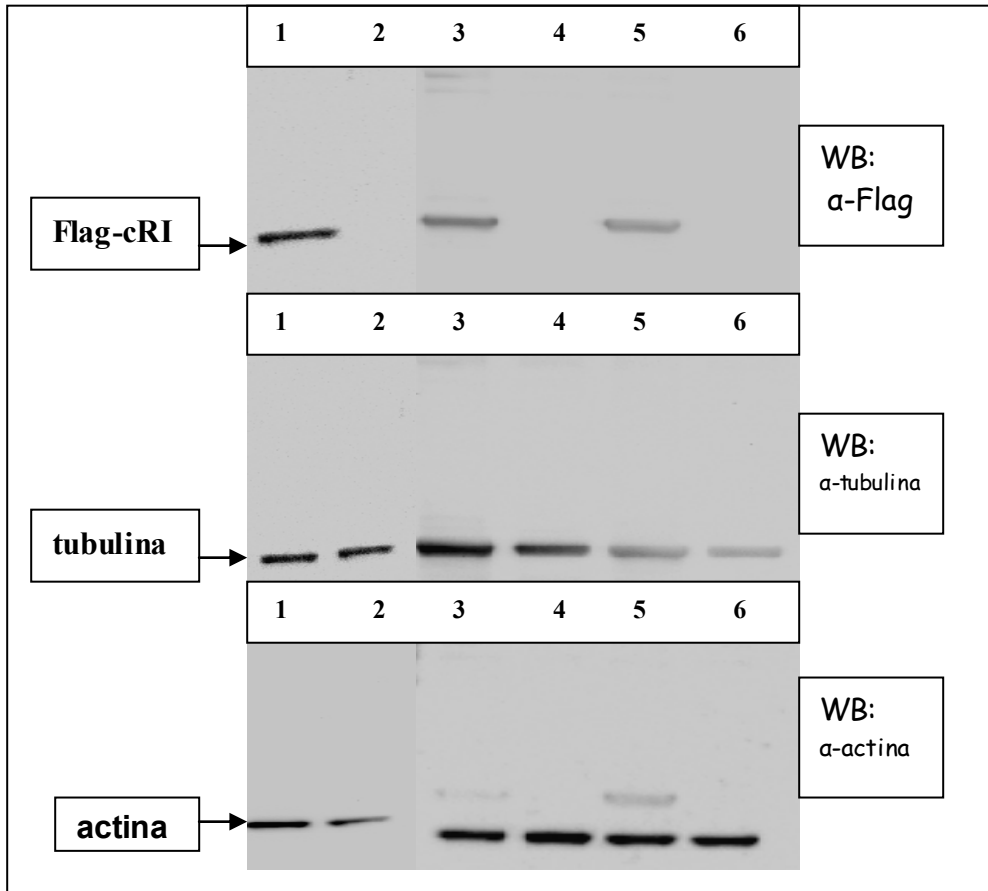


Fig. 21

Analisi in SDS-PAGE 8% e western blotting delle proteine di lisati di cellule HeLa trasfettate con p3xFlag-cRI (linee 1, 3, 5) o con il vettore non ricombinante (linee 2, 4, 6) e trattate con H₂O₂ 500 μM per 30 min (linee 3-4), o con pirogallolo 40 μM per 30 min (linee 5-6), o non trattate (linee 1-2); i lisati, preparati in presenza di NEM, sono separati in SDS-PAGE in assenza di riducenti. Le bande identificate da anticorpi anti-Flag che rivelano cRI ricombinante, anti-tubulina e anti-actina sono indicate.

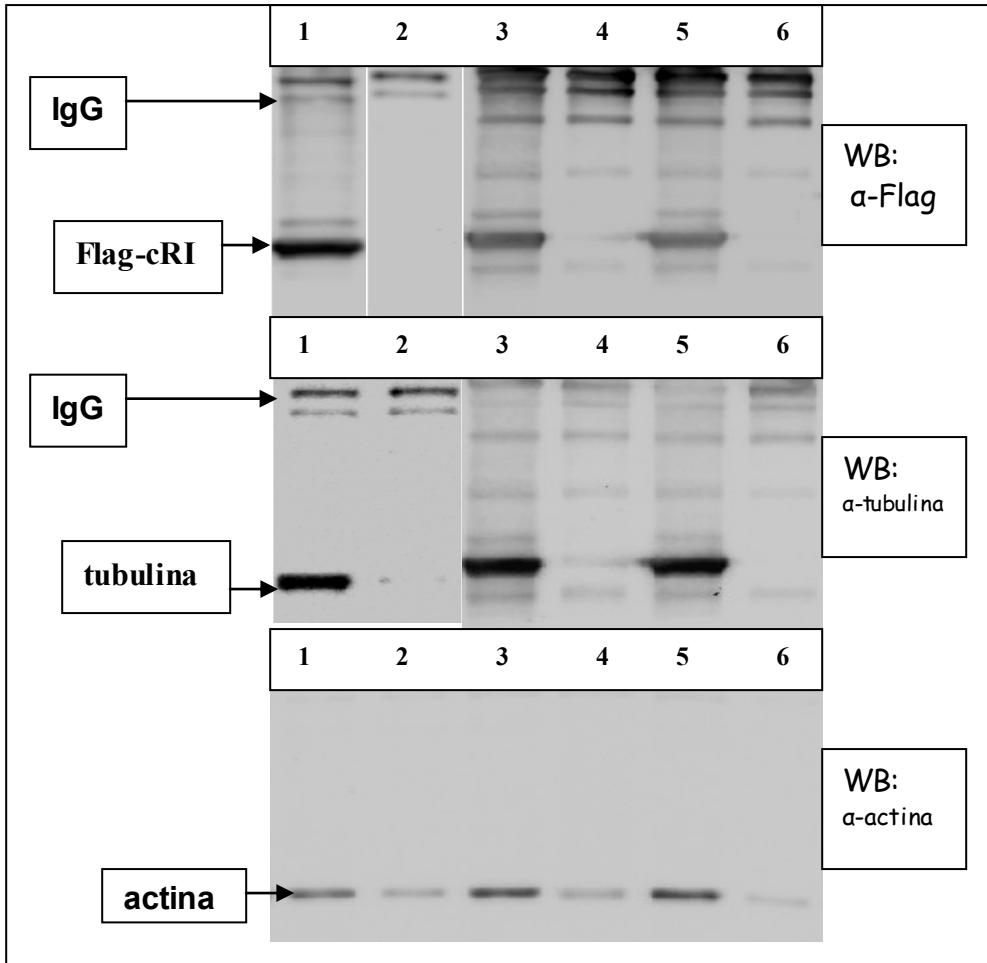


Fig. 22

Analisi in SDS-PAGE 8% e western blotting dei prodotti di immunoprecipitazione (eluiti con il tampone di caricamento Laemmli dalla resina *M2 anti-Flag Affinity Gel*) di lisati di cellule HeLa trasfettate con p3xFlag-cRI (linee 1, 3, 5) o con il vettore non ricombinante (linee 2, 4, 6) e trattate con H₂O₂ 500 µM per 30 min (linee 3-4) o con pirogallolo 40 µM per 30 min (linee 5-6) o non trattate (linee 1-2); i prodotti di immunoprecipitazione, ottenuti da lisati preparati in presenza di NEM, sono separati in SDS-PAGE in assenza di riducenti. Le bande identificate da anticorpi anti-Flag che rivelano cRI ricombinante, anti-tubulina e anti-actina sono indicate.

DISCUSSIONE

L'Inibitore di Ribonucleasi (cRI) è una proteina che prende il nome dalla sua capacità di inibire le Ribonucleasi di tipo secretorio dei mammiferi. Il ruolo biologico di cRI non è probabilmente solo legato a questa sua proprietà, sia per la sua localizzazione intracellulare, sia per la sua conservazione evolutiva e per la sua presenza ubiquitaria in tutte le cellule. Il mio studio ha messo in evidenza, con metodi biochimici e citologici il legame di cRI con proteine del citoscheletro. Tale interazione non richiede lo stato ridotto delle cisteine di cRI, come è invece necessario per l'interazione con RNasi. È noto che l'ossidazione di cRI è un processo cooperativo: l'ossidazione di pochi residui cisteinici induce rapidamente un cambiamento conformazionale che determina un aumento della reattività degli altri tioli della proteina (M. Blasquez et al 1996). Molte delle proteine che coimmunoprecipitano con cRI e che sono state identificate mediante spettrometria di massa sono accomunate dalla presenza nella struttura tridimensionale di cisteine reattive che in seguito a stress ossidativo possono formare ponti disolfurici intermolecolari (I. Dalle Donne et al 2008). La formazione di ponti disolfurici è un meccanismo di protezione e recupero dei tioli reattivi delle proteine intracellulari, poiché impedisce ulteriori ossidazioni non più reversibili che portano alla degradazione delle proteine e consente che i tioli siano riformati al ristabilirsi delle normali condizioni riducenti. cRI, inoltre, non risulta estensivamente glutathionilato né in condizioni basali né in condizioni che favoriscono tale legame. La proprietà di cRI di agire come *scavenger* di radicali liberi (X.Y. Cui & D.N.Pan 2003; S.Wang & H. Li 2005), verosimilmente protegge le strutture del

citoscheletro dall'attacco ossidativo che facilmente nella cellula porta a legame con glutatione. Questa modifica ha un significato regolativo per molte proteine, in particolare l'actina glutationilata destabilizza la struttura delle fibre, (M. Johansson & M. Lundberg 2007; I. Dalle Donne et al 2003) dunque è particolarmente importante che sia protetta da attacco di radicali liberi. La localizzazione di cRI all'interno del nucleo, riscontrata in seguito ad analisi al microscopio confocale e poi verificata con un approccio biochimico, non era stata mai descritta prima d'ora e apre nuovi scenari sulla funzione biologica di questa proteina, che non sono stati affrontati nel mio studio.

BIBLIOGRAFIA

R. Shapiro. Cytoplasmic ribonuclease inhibitor. **Methods Enzymol.** 2001;341:611-28.

B. Kobe and J. Deisenhofer. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. **NATURE** vol 374. 9 March 1995

K.A. Dickson , M.C. Haigis , R.T. Raines . Ribonuclease inhibitor: structure and function. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.** 2005;80:349-74.

N. Dephoure , C. Zhou , J. Villén , S.A. Beausoleil , C.E. Bakalarski , S.J. Elledge , Gygi S.P. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2008 Aug 5;105(31):10762-7. Epub 2008 Jul 31.

B. Kobe , J. Deisenhofer . Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. **Nature.** 1993 Dec 23-30;366(6457):751-6.

J.Hofsteenge in “Ribonucleases : Structures and Functions” (G. D'Alessio and J.F. Riordan) 1997

R.B. Caldwell, A.M. Kierzek, H. Arakawa, Y. Bezzubov, , Zaim, P. Fiedler, S. Kutter, A. Blagodatski, D. Kostovska, M. Koter, J. Plachy, P. Carninci , Y. Hayashizaki, and J.M. Buerstedde. Full-length cDNAs from chicken bursal lymphocytes to facilitate gene function analysis. **Genome Biol.** 6 (1), R6 (2005)

J. Hofsteenge , B. Kieffer , R. Matthies , B.A. Hemmings , S.R. Stone . Amino acid sequence of the ribonuclease inhibitor from porcine liver reveals the presence of leucine-rich repeats. **Biochemistry.** 1988 Nov 15;27(23):8537-44.

F.S. Lee , E.A. Fox , H.M. Zhou , D.J. Strydom , B.L. Vallee_ Primary structure of human placental ribonuclease inhibitor. **Biochemistry.** 1988 Nov 15;27(23):8545-53.

M. Kawanomoto , K. Motojima , M. Sasaki , H. Hattori , S. Goto . cDNA cloning and sequence of rat ribonuclease inhibitor, and tissue distribution of the mRNA. **Biochim Biophys Acta.** 1992 Feb 11;1129(3):335-8.

S.M. Zneimer , D. Crawford , N.R. Schneider , B. Beutler . Mapping of the human ribonuclease inhibitor gene (RNH) to chromosome 11p15 by in situ hybridization. **Genomics.** 1990 Sep;8(1):175-8.

D. Crawford , K. Hagerty , B. Beutler . Multiple splice forms of ribonuclease-inhibitor mRNA differ in the 5'-untranslated region. **Gene.** 1989 Dec 28;85(2):525-31.

M. C. Haigis, C. Park and R. T. Raines. Fluorescence Assay for the Binding of Ribonuclease A to the Ribonuclease Inhibitor Protein **Analytical Biochemistry** 306, 100–107 (2002)

H. Nagano , H. Kiuchi , Y. Abe , R. Shukuya . Purification and properties of an alkaline ribonuclease from the hepatic cytosol fraction of bullfrog, *Rana catesbeiana*. **J Biochem.** 1976 Jul;80(1):19-26.

Y. Aoki , S. Natori . Activation of latent ribonuclease in the fat-body of fleshfly (*Sarcophaga peregrina*) larvae on pupation. **Biochem J.** 1981 Jun 15;196(3):699-703.

M.C.Haigis, E.L.Kurten and R.T.Raines. Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry. **Nucleic Acids Res.** 2003 Feb 1;31(3):1024-32

D.M.Monti and G.D'Alessio. Cytosolic RNase inhibitor only affects RNases with intrinsic cytotoxicity. **J Biol Chem.** 2004 Sep 17;279(38):39195-8

M. Blazquez, J.S.M.Fominaya and J.Hofsteenge. Oxidation of sulfhydryl groups of ribonuclease inhibitor in epithelial cells is sufficient for its intracellular degradation. **J Biol Chem.** 1996 Aug 2;271(31):18638-42

J.M. Fominaya , J. Hofsteenge_. Inactivation of ribonuclease inhibitor by thiol-disulfide exchange. **J Biol Chem.** 1992 Dec 5;267(34):24655-60.

S. Wang and H. Li . Radical scavenging activity of ribonuclease inhibitor from cow placenta. **Biochemistry Moscow.** 2006 May;71(5):520-4.

D.M.Monti, N.M.Gesualdi, J.Matousek, F.Esposito and G.D'Alessio. The cytosolic ribonuclease inhibitor contributes to intracellular redox homeostasis. **FEBS Lett.** 2007 Mar 6;581(5):930-4

B.M.Kim, L.W.Schultz and R.T.Raines. Variants of ribonuclease inhibitor that resist oxidation. **Protein Sci.** 1999 Feb;8(2):430-4

C. Lind ,R. Gerdes , Y. Hammell , I. Schuppe-Koistinen , H.B. von Löwenhielm , A. Holmgren ,I.A. Cotgreave . Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis. **Arch Biochem Biophys.** 2002 Oct 15;406(2):229-40.

I. Dalle Donne, A. Milzani, N. Gagliano, R. Colombo, D. Giustarini and R. Rossi. Molecular Mechanism and potential clinical significance of S-Glutathionilation. **Antioxidants and Redox Signaling.** 2008 Mar;10(3):445-73.

X.Y. Cui and D.N. Pan. The antioxidant effect of ribonuclease inhibitor. **Free Radic Res.** 2003 Oct;37(10):1079-85.

M. Johansson & M. Lundberg . Glutathionylation of beta-actin via a cysteinyl sulfenic acid intermediary. **BMC Biochem.** 2007 Dec 10;8:26.

I. Dalle-Donne , D. Giustarini , R. Rossi , R. Colombo , A. Milzani . Reversible S-glutathionylation of Cys 374 regulates actin filament formation by inducing structural changes in the actin molecule. **Free Radic Biol Med.** 2003 Jan 1;34(1):23-32.